PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

E. BÜNNING-TÜBINGEN, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND **OTTO RENNER**

45. BAND, 4. HEFT

MIT 41 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 16. MAI 1955)

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
SPRINGER-VERLAG
1955

Planta (Berl.)

Preis DM 19.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik.

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland, H. Winkler.* Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald als möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä., von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim,* oder an *Professor Dr. Otto Renner,* (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67.*

Springer-Verlag
Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 2440

45. Band. **Inhaltsverzeichnis.** 4. Heft

Seite

Resch, A., Beiträge zur Cytologie des Xylems. Mit 12 Textabbildungen . . 307

Bogen, H. J., und U. Elste, Zur Physiologie der Acridinorange-Wirkung. Untersuchungen an Hefezellen. Mit 23 Textabbildungen 325

Esdorn, I., und G. Nöll, Untersuchungen über tagesperiodische Schwankungen im Gehalt an Flavonolen bei *Fagopyrum*-Arten. Kurze Mitteilung. Mit 1 Textabbildung 376

Steffen, K., Kern- und Nucleolenwachstum bei endomitotischer Polyploidisierung. (Ein Beitrag zur karyologischen Anatomie von *Pedicularis palustris* L.) Mit 2 Textabbildungen 379

Steffen, K., und F. Walter, licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Feinbau des Chromatophors von *Ankistrodesmus braunii* (Nägeli) Brunnthaler. Mit 3 Textabbildungen 395

Planta, Bd. 45, S. 307—324 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

BEITRÄGE ZUR CYTOLOGIE DES XYLEMS.

Von

ARMIN RESCH.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. Dezember 1954.)

I. Einleitung.

Die Entwicklungsgeschichte der Tracheen und Tracheiden steht in ihrer letzten Phase im Zeichen des Abbaues und der Degeneration des lebenden Zellinhalts. Nun ist aber lebendes Protoplasma Voraussetzung jeder Differenzierungsleistung. Daher sind die Vorgänge, die sich in Zellen oder Zellverbänden abspielen, deren Inhalt bei der Differenzierung zugrunde geht, in entwicklungsmechanischer Hinsicht von besonderem Interesse. Neben den Tracheen und Tracheiden sind die Hyalinzellen des *Sphagnum*blattes ein Beispiel einer Zellentwicklung, bei der Kern und Plasma degenerieren. Bis zu einem gewissen Grade können auch die Siebröhren zum Vergleich herangezogen werden, obwohl bei ihnen nur ein Teil des lebenden Zellinhaltes, nämlich der Kern, zugrunde geht. Die Entwicklungsgeschichte zeigt die jungen Siebröhren in einer starken Abhängigkeit von ihren Geleitzellen, die sich bei den ausgewachsenen, funktionierenden Siebröhren auch physiologisch nachweisen läßt (PHILLIS u. MASON, BAUER). Die Geleitzellen unterstützen also die Siebröhren in mehrfacher Hinsicht; sie stellen mit diesen eine *Funktionseinheit* dar, die über das normale intercellulare Wechselspiel bei den Metaphyten hinausgeht. Diese Einheit kommt auch cytomorphologisch zum Ausdruck, was sich an Macerationspräparaten besonders gut sichtbar machen läßt (RESCH). Mit der gleichen Untersuchungstechnik kann die Entwicklungsgeschichte und Cytologie der Tracheen und Tracheiden dargestellt werden, und zwar wie bei den Siebröhren im Zusammenhang mit „Geleitzellen", also mit eng anliegenden Holzparenchymzellen, die im folgenden *Begleitzellen* genannt werden. (Daneben werden aber auch die älteren Ausdrücke wie Belegzellen oder peritracheale Zellen benützt.) Da bei den Tracheen und Tracheiden der lebende Zellinhalt vollständig abstirbt, ist möglicherweise die entwicklungsphysiologische Bedeutung der Xylembegleitzellen noch wichtiger als die der Geleitzellen bei den Siebröhren. Auch die cytomorphologische Einheit zwischen den Gefäßen und ihren Begleitzellen ist in frappierender Weise durchgeführt und mit derjenigen zwischen Siebröhren und Geleitzellen gleichzusetzen. Einige

der im folgenden beschriebenen cytologischen und anatomischen Phänomene sind da und dort in der älteren Anatomieliteratur schon beschrieben (DE BARY, SANIO, STRASBURGER u. a.). Es ist aber vertretbar, sie zusammen mit den neuen Beobachtungen unter einem Gesichtspunkt darzustellen. An Hand der morphologischen Tatsachen kann dann im theoretischen Teil der Arbeit die Frage diskutiert werden, ob auch zwischen den ausgewachsenen und tätigen Wasserleitungsgefäßen und ihren Begleitzellen eine Funktionseinheit besteht, wie das offensichtlich bei den Siebröhren und Geleitzellen der Fall ist.

II. Beobachtungen an Tracheiden von *Vicia faba*.

Die Präparate wurden mit der Essigcarminquetschmethode gewonnen. Fixierung in Flemming-Heitz 10—24 Std, Aufbewahrung in Alkohol 70%, Färben in Essigcarmin (EC) 0,5%, zuletzt vorsichtiges Kochen und Quetschen auf dem Objektträger zweckmäßig hergerichteter kleiner Stücke oder Schnitte der zu untersuchenden Organe. Die Quetschmethode schließt Fehler aus, die bei der Beurteilung des Zellkernvorkommens in Mikrotompräparaten möglich sind. Außerdem werden Zellen, die durch besonders viele gemeinsame Plasmodesmen und Wandstrukturen verbunden sind, nicht getrennt und zeigen somit deutlich ihren inneren Zusammenhang (vgl. Siebröhren und Geleitzellen, RESCH 1954).

1. Aus den Nerven der Nebenblätter.

Bei der Untersuchung der jungen Nebenblätter aus der oberen Sproßregion fällt auf, daß fast 80% der anscheinend wandfertigen Schraubentracheiden noch Zellkerne und Plasma besitzen (Abb. 1 und 2). Der Plasmabelag ist sehr dünn, was man an denjenigen Stellen sieht, die durch die Präparation etwas gedehnt wurden. Die Kerne erscheinen in ihrer Struktur normal, soweit das durch die verdickte Wand hindurch erkennbar ist, und sind von lang ausgezogener spindelförmiger Gestalt. Bei sehr langen Tracheiden sind auch deren Kerne entsprechend verlängert; es besteht aber nicht immer das gleiche Längenverhältnis zwischen Kern und Tracheiden. Die üblichen Anzeichen der beginnenden Kerndegeneration, wie Chromatinverklumpung und Nachlassen der Färbung, sind noch nicht eingetreten. Diese Tracheiden sind demnach als noch lebend zu bezeichnen. Die anatomische und morphologische Differenzierung der untersuchten Nebenblätter ist aber noch nicht abgeschlossen. Die Zellen der Epidermis zeigen noch keine fertigen Spaltöffnungen. Die stark gefärbten runden Zellen und Kerne in Abb. 2 sind Spezialmutterzellen oder undifferenzierte Schließzellen. Auch beim übrigen Blattgewebe ist die Differenzierung unvollständig und die Blättchen sind noch nicht voll entfaltet. Es kann also noch weitere Zellstreckung vonstatten gehen und die Tracheiden der Nerven müssen diese natürlich mitmachen. Sollen sie dabei intakt bleiben, dann brauchen sie eine wachstumsfähige Wand. Die toten Primanen des Xylems in

der Sproßstreckungszone werden ja deutlich passiv gedehnt oder gar zerrissen.

Bei den Nebenblättern von *Vicia faba* ist also festzustellen, daß der lebende Zellinhalt der Tracheiden bis in die allerletzte Differenzierungs-

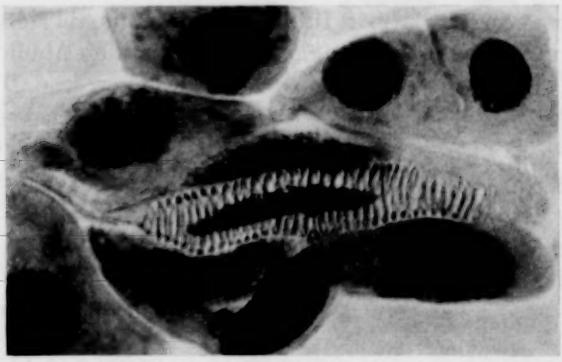


Abb. 1. *Vicia faba*, junges Nebenblatt. Tracheide aus einem Seitennerv, von langgestreckten Scheiden- und isodiametrischen Mesophyllzellen umgeben. EC-Quetschpräp. 980:1.

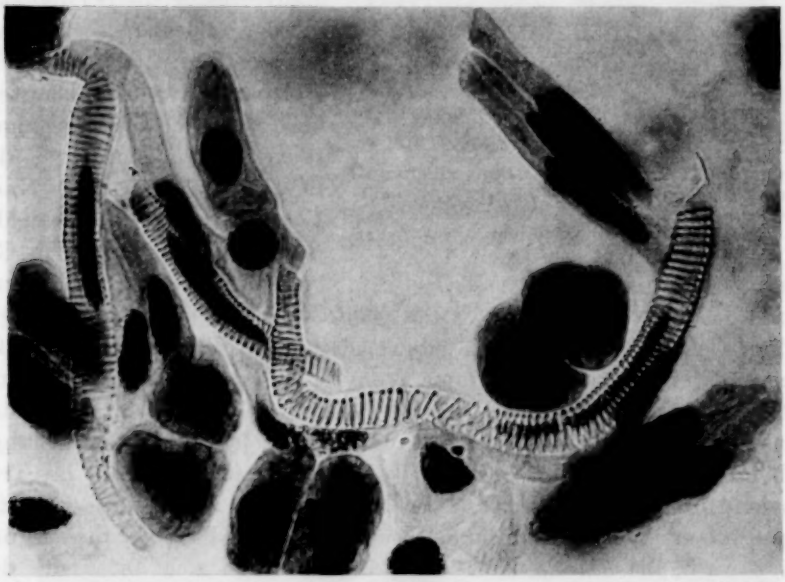


Abb. 2. *Vicia faba*, junges Nebenblatt. Stück eines Seitennervs in seine Bestandteile zerlegt. 3 verschieden lange Tracheiden, denen einige langgestreckte Scheidenzellen seitlich anliegen; in der rechten oberen Bildhälfte außerdem 2 (noch kernhaltige!) Siebröhren mit je einer Geleitzelle. Die runden Doppelzellen sind verschiedene Stadien der Spaltöffnungsentwicklung. EC-Quetschpräp. 590:1.

phase beibehalten wird. In den älteren Nebenblättern zeigen die Tracheiden weder Kern noch Plasma. Es sind allerdings Fälle berichtet,

in denen auch in ausgewachsenen Pflanzenteilen die trachealen Elemente einen lebenden Inhalt führen. LANGE (1891) hat bei vielen Gefäßpflanzen den plasmatischen Zustand der ausgewachsenen Gefäße untersucht. Er findet eine ganze Reihe von Objekten, bei denen das Plasma nach der Ausbildung der Gefäße über die ganze Vegetationsperiode oder einen Teil derselben erhalten bleibt. Das Kernvorkommen in solchen plasmahaltigen Gefäßen erwähnt LANGE nur kurz. Aus den Abbildungen geht aber hervor, daß tatsächlich bei einigen der von ihm aufgeführten Beispiele die Tracheiden noch einen Kern besitzen, z. B. im Knoten des Stengels von *Hordeum*, dessen Streckung abgeschlossen war, sowie in einem ausgewachsenen Stengelstück von *Cuscuta*. Es handelt sich dabei aber meist um sehr kurzgliedrige Tracheidenverbände, die bei *Hordeum* in der Nachbarschaft einer Trachee liegen, also vielleicht Holzparenchym sein könnten, bei *Cuscuta* jedoch die einzigen Wasserleitungselemente des Stengelteils darstellen. Nach VÖCHTING (1888) besitzen die Blätter von *Malva* in den Gelenken Tracheiden mit vollständigem Protoplasma (Chloroplasten!) und „lebende Spiralgefäße". Dies alles sind aber Fälle von untypischen Gefäßen. Im allgemeinen gilt, daß echte Wasserleitungsgefäße des Ferntransportes immer ohne Kern und Plasma sind[1]. Auffallend ist nur in dem gezeigten Beispiel von *Vicia faba*, daß der protoplasmatische Inhalt von Wasserleitungselementen wider Erwarten lange lebend und intakt bleibt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß bei Tracheiden, deren Inhalt immer von einer dünnen Primärwand allseitig umschlossen bleibt, dieses lange „Ausharren" des Protoplasmas begünstigt wird. Bei Tracheen derselben Pflanze lösen sich die Kerne der Einzelelemente bereits vor deren Fertigstellung unter Degenerationserscheinungen auf, wie es LANGE (1891) und LUEHR (1928) schon beschrieben haben. Diese Angaben konnten mit der Essigcarminmethode bestätigt werden (Abb. 3).

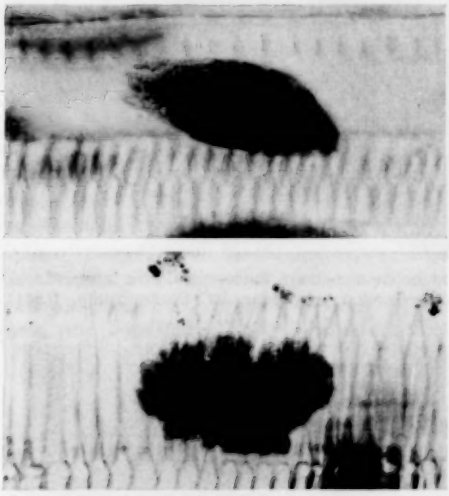


Abb. 3. *Vicia faba*, Sproßachse, Differenzierungszone. Kerne vor der Auflösung in noch nicht fertig entwickelten Tracheen. Chromatin klumpig und zerklüftet. EC-Quetschpräp. 640 : 1.

[1] Die Angaben von LANGE über plasmahaltige Gefäße sind bisher nicht bestätigt worden und müßten nachgeprüft werden, da die Methode des Nachweises anzuzweifeln ist.

2. Aus der Streckungszone des Stengels.

Mit der Quetschmethode sind „histologische" Bilder zu erzielen, die solchen aus Mikrotompräparaten nicht nachstehen. Abb. 4a

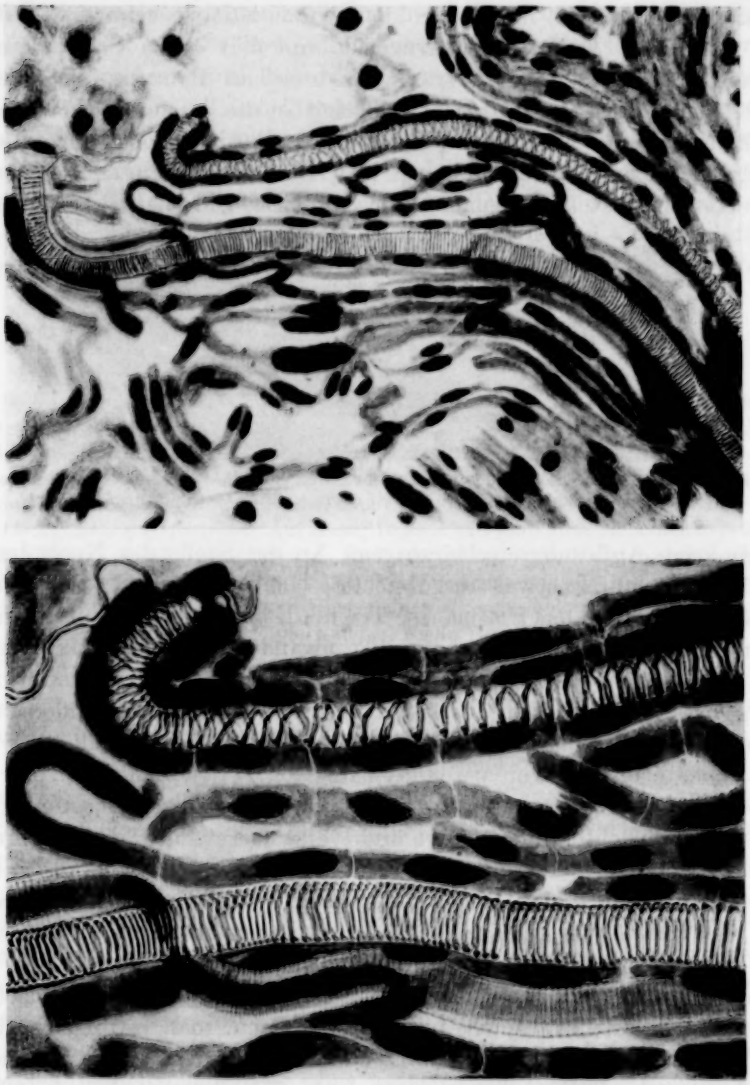


Abb. 4a u. b. *Vicia faba*, Sproßachse, Differenzierungszone. a Übersichtsbild mit 2 sehr langen Tracheiden und Begleitparenchym, b Ausschnitt von a, entlang der unteren Tracheide ein Entwicklungsstadium mit Kern und Plasma. Am unteren Bildrand rechts eine Parenchymzelle in Teilung. (Weitere Erläuterung im Text.) EC-Quetschpräp. a 130:1, b 320:1.

kommt einem Längsschnitt durch das Xylem gleich; man kann gut zwei lange Schraubentracheiden erkennen. Die eine davon hat sehr enge

Windungen, deren Verlauf man nicht genau verfolgen kann, während die Versteifungen der obenliegenden Tracheide eine sehr viel größere Ganghöhe haben und in einer gut erkennbaren Doppelschraubenlinie angeordnet sind. Beide Tracheiden haben weder Kern noch Plasma. Sie sind außerordentlich langgestreckt und man hält sie beim ersten Blick für Tracheen. Entlang der Tracheide mit den engen Schraubenwindungen läuft eine jüngere Tracheide desselben Bautyps, die jene an zwei Stellen kreuzt. Im rechten Bildteil ist die junge Tracheide nicht mehr genau zu verfolgen, da die Wandverdickungen noch sehr schwach ausgebildet sind. Deutlich kann man aber den Kern an der linken Überkreuzungsstelle erkennen (Abb. 4b). Seine Chromatinstruktur zeigt

Abb. 5. *Vicia faba*, Funiculus. Kernloses Siebröhrenglied auf beiden Seiten von Geleitzellen flankiert. Die eine davon quergeteilt. EC-Quetschpräp. 650:1.

noch keine Auflösungserscheinungen. An der Stelle des Nucleolus ist die Kernmembran etwas ausgebuchtet. Links und rechts des Kernes hebt sich deutlich das Plasma der Tracheide ab, da es sich auf der einen Seite durch die Fixierung von der Längswand abgelöst hat. Man könnte das beschriebene Bild lediglich als eine Illustrierung des Differenzierungsvorganges in Tracheiden ansehen, wenn nicht noch etwas anderes auffiele. Die beiden ausdifferenzierten Tracheiden sind in auffälliger Weise ein- oder beidseitig von parenchymatischen Zellen flankiert, die sich durch den stark gefärbten Protoplasten und den engen Zusammenhalt mit den Tracheiden in einer Art und Weise auszeichnen, die sehr an die Geleitzellen der Siebröhren von *Vicia faba* erinnert (Abb. 5). Dort sind allerdings einem Siebröhrenglied eine oder wenige Geleitzellen zugeordnet, die von diesem, d. h. der Siebröhrenmutterzelle abgetrennt werden. Bei den beschriebenen Tracheiden sind aber sehr viele Begleitzellen vorhanden, wobei nichts darüber bekannt ist, ob diese mit den Tracheiden eine gemeinsame Mutterzelle haben, es sei denn, man verfolge die Entwicklungsgeschichte bis ins Spitzen-Meristem zurück. Die Tracheide erfährt bei der Differenzierung eine starke Streckung, während sich die Begleitzellen mehrere Male teilen und daher auf die Länge einer Tracheide sehr viele solcher Zellen zu liegen kommen. Es muß eine Koordinierung des Wandwachstums an der Grenze zwischen Teilungs- und Streckungswachstum vorhanden sein, wenn der ganze Zellverband in die Länge

wächst. Die Wände zwischen Tracheiden und Begleitzellen sind offensichtlich sehr eng miteinander verbunden und gemeinsam gewachsen. Würde sich nämlich die Tracheide durch Spitzenwachstum zwischen die kleinzelligen Parenchymreihen schieben, wäre die Verbindung der Wand bei der Maceration leichter zu lösen. So zeigen die abnormalen Zellspitzen der *Vicia*-Siebröhren, die nachträglich zwischen die anderen Zellen eingewachsen sind, keinerlei Zusammenhalt mit diesen (Resch 1954, S. 90ff.). Die Tracheidenbegleitzellen fallen durch eine etwas stärkere Plasma- und Kernfärbung gegenüber den normalen Zellen auf, allerdings nicht so deutlich wie die Geleitzellen der Siebröhren. Sie stellen aber mit den Tracheiden eng verbundene Begleitzellen dar, die von den übrigen Holzparenchymzellen abgehoben sind. Diese Gefäßbegleitzellen lassen sich an einem anderen Objekt noch besser studieren.

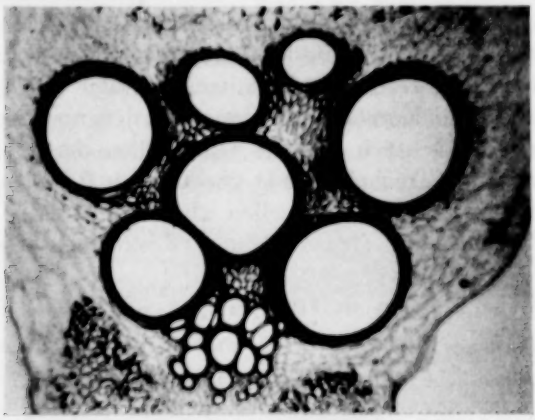
III. Beobachtungen an Tracheen von *Cucurbita Pepo*.

Aus verschieden alten, aber ausgewachsenen Stengelinternodien.

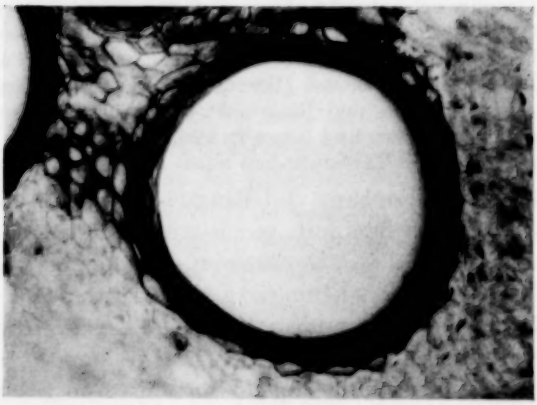
Die Internodienstücke wurden in Alkohol-Eisessig 2:1 fixiert. Die Gefäßbündel lassen sich leicht isolieren, wenn man die Stengelhohlzylinder längs aufschneidet, die auf der Innenseite in die Markhöhle vorspringenden Gefäßteile mit der Pinzette erfaßt und vom Grundgewebe abzieht. Diese Gefäßbündelstreifen werden in Essigcarmin (2,5%) 2—5 Tage gefärbt, auf dem Objektträger zerteilt, erwärmt und mit dem Deckgläschen gequetscht. Auf diese Weise erhält man gute Macerationspräparate der Xylem- und Phloemelemente. Hier seien aber nur die Holzteile besprochen. Die Primanen mit Schrauben- und Ringverstärkungen und die kleineren Tüpfelgefäße sind schlecht zu trennen und liegen zu mehreren gebündelt. Dagegen kann man die großen Gefäße (mit Tüpfelwänden) leicht einzeln bekommen.

Die Bündel der Schrauben- und Ringtracheen sind auf der ganzen Länge von Begleitzellen flankiert, genau wie die Tracheiden von *Vicia faba*. Die Tüpfeltracheen jedoch scheinen ohne solche Begleitzellen zu sein. Erst bei näherer Untersuchung ist zu bemerken, daß der gut erkennbaren Tüpfelwandung noch andere Zellen aufliegen. Diese enthalten Plasma und Kern und haben sehr stark verdickte und verholzte Wände, die nach allen Seiten reich mit Tüpfeln versehen sind (Abb. 7). Es sind die sog. peritrachealen Holzparenchymzellen, die durch Essigsäuremaceration nicht von den Gefäßen getrennt werden. Zur Prüfung des Zusammenhaltes der Holzparenchymzellen mit den Tracheenwänden wurden noch Macerationspräparate mit dem Schulzeschen Gemisch hergestellt, welches sehr viel stärker wirkt als Essigsäure. Auch nach Anwendung dieses Macerationsverfahrens werden die den Tracheen aufliegenden Begleitzellen nicht ohne weiteres von diesen getrennt. Erst wenn man mit dem Deckgläschen sehr stark schräg auf die Zellen drückt, lösen sie sich in Gruppen oder einzeln von den Gefäßen. Der protoplasmatische Inhalt ist natürlich aus den Zellen entfernt und kann daher nur an den Essigcarminpräparaten untersucht werden.

Der Durchmesser der (ausdifferenzierten) Tüpfeltracheen variiert im Gegensatz zu den Ring- und Schraubentracheen sehr stark. Die engen Tüpfelgefäße entsprechen letzteren im Durchmesser (etwa 50 μ) (*angustivasales* Xylem), während die weiten bis zu 300 μ und mehr lichte Weite



a

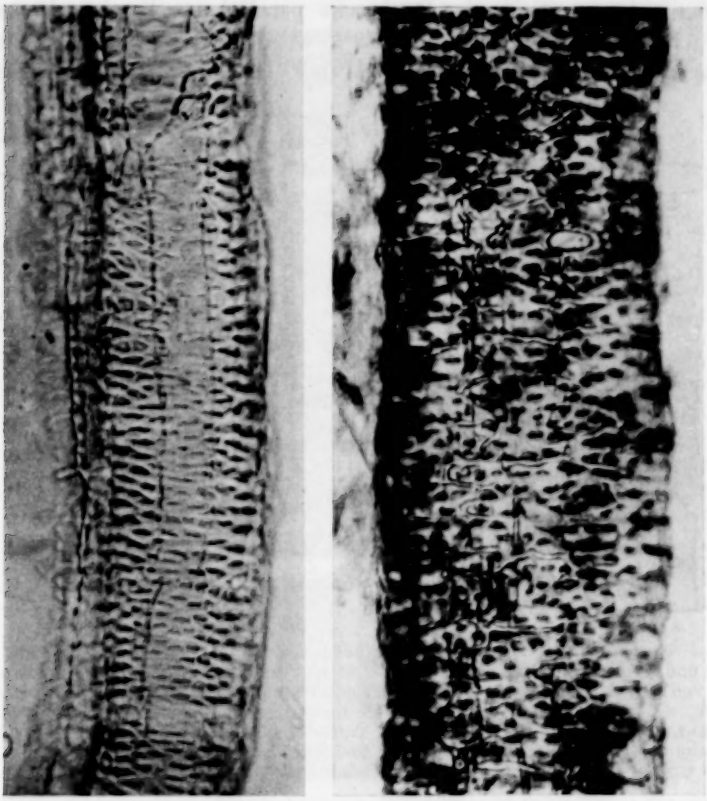


b

Abb. 6a u. b. *Cucurbita Pepo*, Stengelquerschnitt, Holzteil eines Gefäßbündels. a Unten die Gruppe der englumigen Gefäße, die insgesamt von Holzparenchym umgeben sind, während bei den weitlumigen Gefäßen jedes für sich mindestens eine Schicht von Belegzellen besitzt. b Eines der größeren Gefäße mit der sehr stark gefärbten peritrachealen Zellschicht (die Zellwände sind kaum erkennbar). Mikrotompräp. des Bot. Inst. Freiburg. Gentiana-Eosin. a 50:1, b 125:1.

haben (*amplivasales* Xylem). Die kleinen Tüpfeltracheen sind nur teilweise von Holzparenchymzellen umgeben. Bei allen größeren ist die Parenchymscheide aber lückenlos. Ein Querschnitt durch ein *Cucurbita*-Gefäßbündel erklärt diesen Unterschied ohne weiteres. Die englumigen Gefäße der ersten Holzproduktion des Cambiums liegen dicht aneinander

und nur einzelne Teile der Gefäßwandung sind in Berührung mit Holzparenchymzellen. Dagegen werden die Tracheen des amplivasalen Xylems allseitig von mindestens einer Holzparenchymschicht umsäumt. Sie liegen immer separat und grenzen nie direkt aneinander (Abb. 6a). Auffallend ist noch die starke Färbung der innersten Parenchymschicht.



a b

Abb. 7a u. b. *Cucurbita Pepo.* Durch Maceration freigelegte Tracheen aus dem Gefäßbündel der Sproßachse, mit den anhaftenden Begleitzellen. a Maceration mit SCHULZEschem Gemisch. Die beiden tüpfelfreien Zonen geben die Länge des Tracheengliedes an. Auf diesem langgestreckte Begleitzellen, deren Längswände noch ziemlich gerade verlaufen. An den Stellen, wo ein Tracheentüpfel berührt wird, sind die Wände der Parenchymzelle ebenfalls unterbrochen (getüpfelt!). b Maceration mit Essigcarmin. Eine etwas größere Trachee. Die Begleitzellen sind kürzer und breiter und haben verzahnte Seitenwände. Ihre Kerne sind teilweise erkennbar (vgl. Abb. 8). Im oberen Drittel eine ovale Intercellulare, unter der keine Tüpfel in der Trachee ausgebildet sind. Quetschpräp. 365:1.

Die zweite und dritte Schicht ist bereits heller als die erste bzw. überhaupt nicht stärker gefärbt als die weiter außen liegenden Parenchymzellen (Abb. 6b). Bei Maceration bleibt nur die erste peritracheale Zellage an

der Gefäßwandung hängen. Oft sind dann an jener die Ansatzstellen der zweiten Schicht zu sehen (Abb. 10).

Die Größen der Begleitzellen *einer* Trachee sind zwar etwas unterschiedlich, aber die Zellform ist ziemlich einheitlich, wird jedoch bei den *verschieden großen* Tracheen charakteristisch abgewandelt. Die Parenchymzellen der engen Tüpfelgefäße haben einen rechteckigen Grundriß, wobei die längste Seite des Rechtecks parallel zur Tracheenlängsachse liegt (a in Abb. 7, 8, 9). Die Länge ist $^1/_1$—$^1/_2$ der eines Tracheengliedes, die Breite etwa $^1/_3$ des Durchmessers der Trachee. Exakt rechteckige

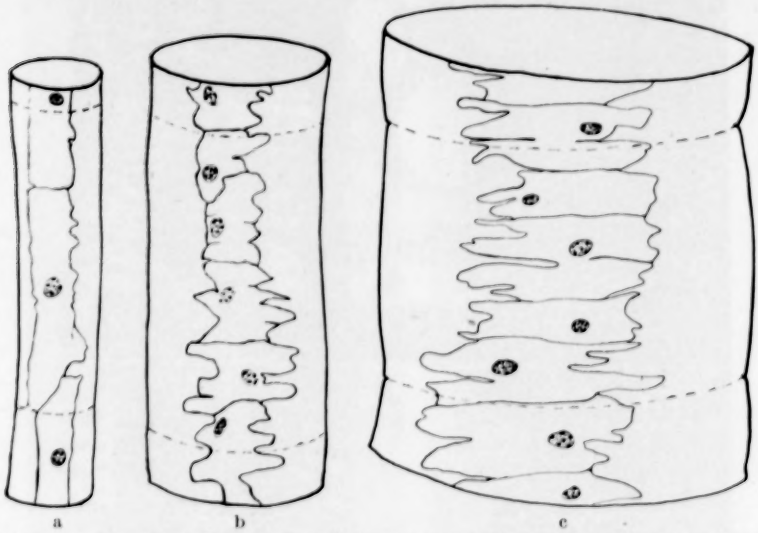


Abb. 8 a—c. *Cucurbita Pepo*, halbschematische Darstellung der verschiedenen Gefäßgrößen und Holzparenchymtypen, nach Macerationspräparaten gezeichnet. Jeweils nur eine Reihe von Begleitzellen dargestellt, da die anderen wegen der Gefäßrundung verzeichnet würden. a Trachee des kleinsten Typs mit Holzparenchymzellen, die teils gerade, teils gewellte Längswände haben. b Mittelgroße Trachee. c Trachee vom größten Typ mit stark gekammerten und durch Zellfortsätze verbreiterten Parenchymzellen. Die Enden der Gefäßglieder jeweils durch die gestrichelte Linie angedeutet. Etwa 220:1.

Peritrachealzellen gibt es wenig, mindestens stehen die kurzen Querwände schräg. Meist aber sind die Längswände ± gewellt und nur die Grundform ist noch rechteckig (Abb. 8a). Das Längen-Breitenverhältnis ist im Durchschnitt 6,5:1. Bei Tüpfelgefäßen mit 50—100 μ Durchmesser wird aber die lang-rechteckige Form der Begleitzellen aufgegeben. Sie sind in der Längsrichtung kürzer, dafür aber in der Querrichtung breiter (b in Abb. 7, 8, 9). Der Zelldurchmesser in der Längsrichtung beträgt $^1/_2$—$^1/_5$ eines Tracheengliedes, der Querdurchmesser trotz größeren Durchmessers der Trachee immer noch ein Drittel von diesem (Längen-Breitenverhältnis der Begleitzellen 1,9:1). Deren Längswände sind stark gebuchtet. In das Zellinnere springen Membranleisten vor, die oft eine

echte Zwischenwand vortäuschen, da sie fast die ganze Zelle durchsetzen (Abb. 10). Andererseits haben Zellen dieser Art auch Auswüchse, kleine Fortsätze mit tüpfelartig verengertem Grund (Abb. 9b, links). So kommt eine unvollständige Abkammerung des Zellraumes und eine starke Verzahnung der Zellen zustande. Am ausgeprägtesten ist diese Septierung und die Breitenzunahme der peritrachealen Zellen bei den

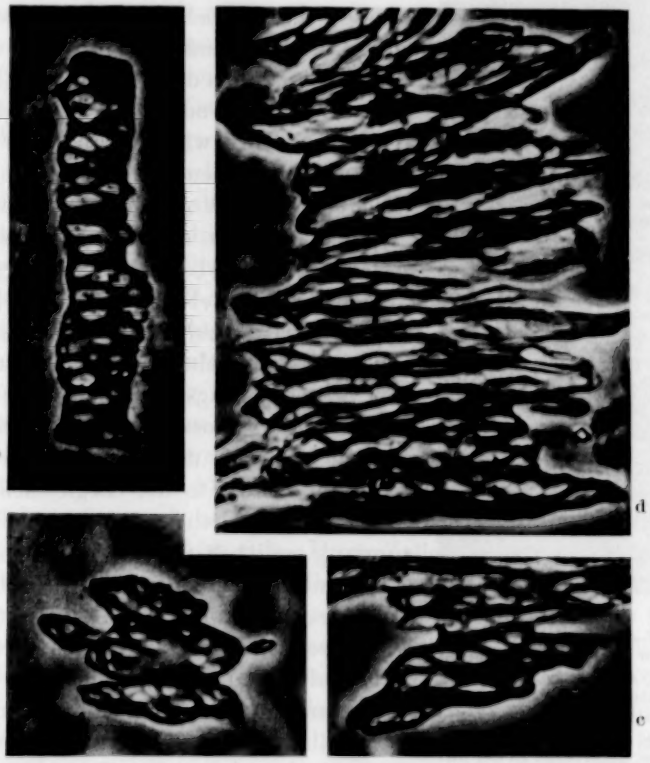


Abb. 9a—d. *Cucurbita Pepo.* Durch starken Druck isolierte Begleitzellen. a Von den englumigen, d von den weiten Tüpfelgefäßen des Stengels; b—c Zwischenformen. Die mit den Hoftüpfeln der Tracheenwand korrespondierenden Tüpfel der Begleitzellen sind als helle Stellen erkennbar. Der Zellinhalt ist durch die Maceration entfernt. Bei d kann man die Einzelzellen nur noch schlecht erkennen. Diese ganze Zellreihe dürfte aus einer Mutterzelle durch Querteilung entstanden sein. SCHULZEsches Gemisch, Quetschpräp. Phasenkontrastaufnahme. 385:1.

größten Gefäßen (100 μ Durchmesser und mehr). Dort sind sie bis 3—4mal breiter als die Begleitzellen der englumigen Gefäße (Abb. 8c). Das Längen-Breitenverhältnis ist nun ganz verschoben und beträgt 1:2! Die Septierung durch die Querleisten, die in das Zellinnere hineinragen, ist so stark, daß es schwer fällt, die Einzelzellen zu unterscheiden. Die „Längswände" sind hier nicht nur einfach gewellt, sondern zipfelartig

ausgezogen. Dadurch entsteht eine noch stärkere Verzahnung der benachbarten Peritrachealzellen, die sie noch zusammenhalten lassen, wenn man sie mit Gewalt von der Tracheenwand abgequetscht hat (Abb. 9d).

Es wäre nun die Entwicklungsgeschichte der Tracheen mit ihren Begleitzellen bei der Erweiterung der Tracheenwand zu untersuchen. Aber ohne direkte Prüfung kann man aus obigen Befunden bereits einiges darüber aussagen. Die Zellen einer Gefäßanlage in Cambiumnähe sind von 8 prospektiven Holzparenchymzellen direkt umgeben (Abb. 11). Je mehr eine Trachee bei der Differenzierung erweitert wird, desto mehr müssen die peritrachealen Zellen in tangentialer Richtung mit der Außenwand in die Breite wachsen. Sofern sie keine Längsteilungen erfahren, müßte bei den verschieden weiten Tracheen die Zellzahl je Umfang immer gleich sein, nämlich 8. Dies festzustellen ist aber nicht so leicht. Die auf einer macerierten Trachee ringsum aufsitzende Begleitzellen sicher auszuzählen ist unmöglich. Durch Vergleich des Umfangs der Trachee und der Zellbreite der Begleitzellen kann eine durchschnittliche Zellzahl je Tracheenumfang ermittelt werden. Aber wegen des sehr unterschiedlichen Radius und des verschiedenen Grades der Deformierung der Tracheen sind die gemessenen Werte nicht stichhaltig genug. Die mit Vorbehalt unternommenen Messungen ergaben 6,5 bis 9,0 Zellen je Tracheenumfang, mit einem Mittelwert nahe bei 8. Es ist dann anzunehmen, daß bei der Tracheenentwicklung die direkt anliegenden Parenchymzellen sich nicht oder höchstens einmal längsgeteilt haben. Andererseits kann beim Wachstum der Gefäßanlage aber auch eine der acht angrenzenden Zellen abgedrängt werden, z. B. eine der an den Ecken liegenden. Dann ist die Zahl der umgebenden Zellen trotz einer Längsteilung wieder acht. Messungen an Querschnitten sind ebenfalls mit sehr viel Unsicherheitsfaktoren behaftet. Die auf den Tracheen senkrecht stehenden Längswände der Begleitzellen sind schlecht erkennbar, vor allem bei den weiten Tracheen (Abb. 5b), was erklärlich wird, wenn man die Struktur dieser Zellen kennt. Man kann die falschen und

Abb. 10. *Cucurbita Pepo*. Aufsicht auf den Holzparenchymmantel der in Abb. 6b gezeigten Trachee. Von den beiden Zellen in der Mitte, bei denen die Kerne zu erkennen sind, ist die untere durch eine Scheinwand beinahe vollständig unterteilt. In der linken Bildhälfte die Ansatzstellen einer langgestreckten Zelle der zweiten Parenchymschicht. EC-Quetschpräp. etwa 600:1.

die echten Scheidewände der ausgebildeten Holzparenchymzellen kaum unterscheiden. Daher werden in gezeichneten Querschnitten meist zuviel Begleitzellen je Trachee dargestellt.

Sanio ist (wie Hartig) der Auffassung, daß die prospektiven Holzparenchymzellen nur Querteilungen erfahren; de Bary jedoch schreibt, sie seien „vorwiegend durch Querteilung" gekammert. Diese abgelaufenen Querteilungen sind viel leichter festzustellen. Die Cambiumzellänge ist in den untersuchten gestreckten Sproßregionen ziemlich konstant, was auch an der etwa gleichen Länge der Tracheenglieder der verschieden weiten Gefäße zu erkennen ist (Abb. 8). Die langgestreckten Peritrachealzellen der engen Gefäße erfahren bei ihrer Differenzierung keine oder höchstens eine Querteilung; meist sind sie nämlich gleich lang wie die Tracheenglieder. Bei den stärker gebreiteten Begleitzellen, von denen 4—6 auf die Länge eines Tracheengliedes kommen, sind entsprechend viele Querteilungen abgelaufen. Diese Teilungen müssen schon in sehr frühen Stadien der Tracheenentwicklung erfolgt sein, da erst später eingezogene Querwände durch ihre dünneren Membranen auffallen würden. Trotzdem bleiben die aus *einer* Cambiumzelle hervorgegangenen Begleitzellen auch bei der gewaltsamen Ablösung von der Trachee in Gruppen vereinigt (Abb. 8d). Diese Zellgruppen veranschaulichen auch, wie groß die peritrachealen Zellen der weiten Tracheen sein müßten, wenn die Unterteilung der Cambiumabkömmlinge unterbliebe. Eine gewisse Zellgröße wird aber nicht überschritten; wächst die Zelle in die Breite, dann laufen entsprechend viele Querteilungen ab. Diese Zellmindestgröße ist wohl weniger physiologisch als mechanisch wichtig. Die Abstützung der Zellumina durch die Septierungswände zeigt ja schon, daß die Peritrachealzellen nicht zuletzt eine mechanische Funktion bei der Festigung der stark beanspruchten Wandungen der weiten Gefäße haben. Auch die extreme Verzahnung jener Zellen bedeutet eine Erhöhung der Festigkeit der ganzen Trachee. Die nur längsgestreckten Zellen der zweiten Parenchymschicht (Abb. 10) ergeben durch die Kreuzung im Längsverlauf eine weitere mechanische Verstärkung des Parenchymmantels (Strasburger 1891, Zimmermann 1922).

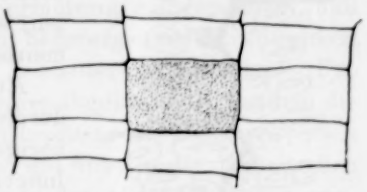


Abb. 11. Schematische Darstellung eines Querschnitts durch eine Gefäßanlage mit ihren Begleitzellen in Cambiumnähe vor der Ausdifferenzierung.

Wenn wir eine sehr enge Zellgemeinschaft zwischen den Tracheen und ihren peritrachealen Zellen feststellen, so müßte sich dies auch in der Angleichung des Tüpfelmusters der Trachee an die Zellumrisse der aufliegenden Zellen zeigen. Die rechteckigen Begleitzellen der engen Gefäße mit wenig gewellten Wänden laufen aber fast ohne Ablenkung

über die Tüpfel der Tracheenwand hinweg (Abb. 7a). Doch sind sie an solchen Stellen, wo sie einen Tüpfel überziehen, selbst getüpfelt, so daß nie eine sekundär verdickte Membran an die Schließhaut des Tracheentüpfels anstößt. Diese regelmäßigen Begleitzellen gibt es aber nur selten und meist sind die Wände, wie oben beschrieben, stark gewellt. Die Wandführung ist dann so angelegt, daß die Schließhäute der Tracheentüpfel umgangen werden (Abb. 7b, 12). Es ist aber festzustellen, daß die Tracheentüpfelung nicht autonom ist. Das Tüpfelmuster wird bis zu einem gewissen Grad von dem Wandverlauf der Begeitzellen beeinflußt (Abb. 12). Ähnliches ist zu beobachten, wenn ein Gefäß an verschiedenartige Elemente grenzt (sog. *Vasa mixta*, DE BARY).

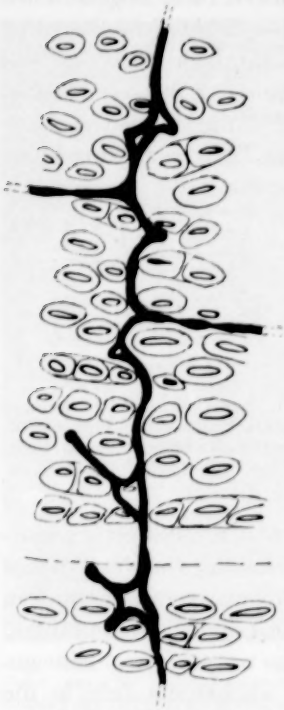


Abb. 12. *Cucurbita Pepo*. Zellwanddifferenzierung der peritrachealen Zellen. Bildung „unechter Intercellularen" durch Membranvorsprünge. In der zweituntersten Intercellularen ein angefangener Tüpfel. Die Hoftüpfel zu zweien oder dreien zusammengefaßt. Die Wand verläuft hier aber immer peinlichst genau zwischen den Tüpfeln. SCHULZEsches Gemisch Quetschpräp. 980:1.

Auffallend sind die Intercellularen, die durch eigenartige Membranbildungen vom übrigen Zellinhalt abgekapselt werden (Abb. 12). Innerhalb dieser untypischen Intercellularen unterbleibt die Hoftüpfeldifferenzierung. Beim Aufbau der Tracheenwand fehlt die Plasmawirkung der Begleitzellen von der Außenseite her. Es kann nun allerdings vorkommen, daß bereits ein Primordialtüpfel vor der Abschnürung des Plasmas angelegt worden ist (in Abbildung 12, unten). Die sekundäre Membran der Tracheenwand ist aber an dieser Stelle ohne Tüpfelhof und schließt sie vollkommen ab. Aber auch echte Intercellularen treten zwischen den peritrachealen Belegzellen auf; diese sind in der Aufsicht rund oder oval. Die Tracheenwand ist dort ebenfalls ohne Tüpfel (Abb. 7b). ZIMMERMANN (1922) konnte bei *Peponium* (einer Cucurbitacee) zeigen, daß die Zellen der zweiten peritrachealen Parenchymschicht in diese Intercellularen hineingewachsen sind und dadurch direkt an die Tracheen stoßen. Aber auch dann werden keine Tüpfel ausgebildet; eine Verbindung zwischen Tracheen und der äußeren Parenchymscheide ist somit nicht vorhanden. Die einfachen Hoftüpfel der großen Gefäße sind also nur an solchen Stellen ausgebildet, an die das Plasma lebender Holzzellen der inneren Parenchymschicht angrenzt. Dadurch ist eine Luftabdichtung der Tracheen erreicht, die es erlaubt, daß die

negative Spannung in den wasserhaltigen Gefäßröhren erhalten bleiben kann und keine Luft aus den Intercellularen nachgesaugt wird. Dieser parenchymatische Schutzmantel um Gefäße oder Gefäßgruppen ist eine der Voraussetzungen, die für die Erhaltung des Wasserfadens im Sinne der Kohäsionstheorie gemacht werden müssen (Renner). Das Vorhandensein lebender Zellen in der Nähe der toten Leitungsbahnen ist die notwendige Bedingung für die dauernde Funktionsfähigkeit der Gefäße. „Die Gefäße und Fasern des Holzes verlieren das Wasser, wenn das Holzparenchym stirbt" (Renner 1925).

IV. Schlußbetrachtung.

Von manchen Autoren wurde die Vermutung ausgesprochen, daß die lebenden Holzparenchymzellen beim Saftsteigen selbst mitwirken können. Man ist aber doch von den „osmotischen Theorien" (Ursprung 1935) des aufsteigenden Saftstromes abgekommen, seitdem die ziemlich allgemein anerkannte Kohäsionstheorie solche Hilfshypothesen erübrigte (vgl. aber Preston 1952). Dagegen dürften die Begleitzellen bei der oft beobachteten Wiederauffüllung der Gefäße beteiligt sein. Schon Schwendener vermutete, daß dabei die Nachbarzellen im Spiele sein könnten. Bode beobachtete an verletzten Gefäßen *(Impatiens)* die Einschmelzung der Luftblasen. Eigenartigerweise erfolgt diese aber nicht von den Enden her, sondern es entstehen zuerst in den einzelnen Blasen mehrere Quersepten aus Wasser, die sich allmählich vergrößern, bis zuletzt auch diese Restblasen verschwinden und damit der Wasserfaden wieder kontinuierlich geworden ist (nach 4—5 Tagen). Bode läßt die Frage offen, auf welche Weise diese Wasserabscheidung erfolgt. Münch gibt eine Erklärung, wie man sich die Wiederauffüllung der Gefäße vorstellen könnte. Die eingedrungene Luft hat eine aktivierende Wirkung auf die Begleitzellen. Die dabei möglicherweise auftretenden Konzentrationsdifferenzen innerhalb der Protoplasten der einzelnen Holzparenchymzellen können gerade an den lufthaltigen Stellen Wasser austreten lassen. Damit die Luftblasen verschwinden, muß das darin vorhandene Gas im Gefäßwasser gelöst werden. Stark konkave Menisken üben infolge der Oberflächenspannung des Wassers einen erheblichen Druck auf die eingeschlossene Luft aus, der um so größer ist, je kleiner der Durchmesser der Gasblasen ist. Unter diesem capillaren Druck löst sich das Gas im umgebenden Wasser (Renner 1942). Findet außerdem tatsächlich ein Einpumpen von Wasser durch die Parenchymzellen der Gefäße statt, so kann die Lösung der Gasblasen auch noch durch diesen Sekretionsdruck befördert werden.

Daß natürlich auch umgekehrt ein Wasseraustausch von dem Gefäß zu den Begleitzellen möglich ist, braucht nicht weiter erörtert zu werden.

Die überaus reiche Tüpfelung der Tracheenwände begünstigt den Wasserdurchtritt in beiden Richtungen. Nach den heutigen Kenntnissen ist also zu sagen: für den Wassertransport selbst spielen die Begleitzellen der Gefäße oder Gefäßgruppen eine nur passive, aber wichtige Rolle, indem sie den notwendigen luftundurchlässigen Mantel um die Wasserleitungsbahnen bilden. Doch können sie mittels Osmose den Gefäßen Wasser entnehmen oder aber an sie abgeben.

Damit wäre die physiologische Bedeutung der peritrachealen Zellen charakterisiert. Daneben ist die oben erläuterte mechanische Hilfsfunktion dieser Zellen zu beachten, ohne die die Gefäßwandung den Beanspruchungen nicht gewachsen wäre. Und als drittes wäre noch die Aufgabe der Gefäßbegleitzellen bei der Differenzierung zu besprechen. Ihr Einfluß auf die Struktur der zugehörigen Gefäßwandungen läßt einen weitgehend koordinierten Bauplan in diesen Zellverbänden vermuten. Möglicherweise erfolgt die letzte Bauperiode an der Tracheenwand und auch die Auflösung der Querwände ganz unter dem Einfluß der Protoplasten der angrenzenden Zellen (vgl. FLACH 1924). Ein weiterer Hinweis für diese enge Verbundenheit ist das Verhalten dieser Zellgemeinschaften bei der Maceration. Nach Essigsäurepräparation lassen sie sich gar nicht trennen und nach Behandlung mit dem kräftiger wirkenden SCHULZEschen Gemisch nur schwer. Bei den Siebröhren und Geleitzellen konnte gezeigt werden, daß eine über das Normale hinausgehende Plasmodesmenverbindung für die Nichttrennung an der Mittellamelle verantwortlich ist (RESCH). Da die Tracheen aber plasmafrei sind, können Plasmabrücken nicht wirksam werden. Doch wäre es denkbar, daß die Wand und vor allem die Tüpfelmembran vom Plasma der Parenchymzellen durchsetzt ist, ähnlich wie die Epidermisaußenwand auch Plasmodesmen besitzen kann, ohne daß eine Verbindung zu einem Nachbarprotoplasten vorhanden wäre. Ein anderer Grund zur Nichttrennung bei Maceration wäre dadurch gegeben, daß in die Mittellamelle Substanzen eingelagert sind, die die Auflösung erschweren oder verhindern. So sind z. B. die englumigen Gefäßgruppen sehr schlecht voneinander zu trennen, obwohl zwischen ihnen keine Plasmodesmen mehr vorhanden sind. Neben der Verfestigung der Mittellamelle durch chemische Veränderungen können die primären Wände zweier Zellen durch Fibrillen, die die Mittellamelle durchsetzen und nicht aus Pektin bestehen, aneinander geheftet sein und so der Macerierung widerstehen (MÜHLETHALER). Welche Möglichkeiten auch verwirklicht seien, die Begleitzellen verhalten sich so, als ob sie Bestandteil der Trachee wären, während bei den anderen Holzparenchymzellen die Maceration ohne weiteres wirksam wird.

Es konnte gezeigt werden, daß die Begleitzellen der großen Gefäße obligatorisch sind. Das ist eine weitere Parallele zu den Siebröhren und Geleitzellen, die eine entwicklungsgeschichtliche, cytologische und phy-

siologische Einheit darstellen. Sie bilden, wie die Tracheen mit ihren Parenchymzellen, eine Zellgemeinschaft, die über die normale Abhängigkeit und Korrelation der Zellen in einem vielzelligen Organismus hinausgeht. Die Spezialisierung ist bei den Zellgebilden der Tracheen oder Siebröhren aufs höchste gesteigert. Der Protoplast, der wichtigste Zellbestandteil, wird ganz oder teilweise der Spezialisierung, d. h. der Funktion geopfert. Je zugespitzter die Differenzierung ist, um so stärker ist die Mitwirkung von Hilfszellen notwendig, die diese Einseitigkeit sowohl während der Entwicklung als auch bei der Funktion kompensieren und damit ermöglichen.

Zusammenfassung.

Die vorliegenden Untersuchungen sind Einzelbeobachtungen an Xylemzellen von *Vicia faba* und *Cucurbita Pepo*. Sie sollen auf die besonderen entwicklungsgeschichtlichen Verhältnisse aufmerksam machen, die bei der Tracheen- und Tracheidendifferenzierung vorliegen. Es ist anzunehmen, daß die an die Wasserleitungsgefäße direkt angrenzenden lebenden Holzparenchymzellen, hier Begleitzellen genannt, eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung der Gefäßwandung spielen. Der geschlossene Holzparenchymmantel, der die Gefäße umgibt, ist außerdem Voraussetzung für die Erhaltung eines kontinuierlichen Wasserfadens und Aufrechterhaltung der Saugspannung in den Tracheen. Man kann daher von einer entwicklungsgeschichtlichen und physiologischen Einheit zwischen den Gefäßen und ihren Begleitzellen sprechen. So betrachtet, stellen die Xylem-Begleitzellen eine Parallele zu den Geleitzellen der Siebröhren dar, die mit diesen ebenfalls eine Funktionseinheit darstellen.

Literatur.

Bary, A. de: Vergleichende Anatomie der Vegetationsorgane der Phanerogamen und Farne. Leipzig 1877. — Bauer, L.: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. Planta (Berl.) **42**, 367—451 (1953). — Bode, H. R.: Beiträge zur Dynamik der Wasserbewegung in den Gefäßpflanzen. Jb. wiss. Bot. **62**, 92—127 (1923). — Esau, Katherine: Plant Anatomy. New York u. London 1953. — Flach, P.: Cytologische Untersuchungen über die Gefäßbildung bei *Cucurbita pepo*. Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math. naturwiss. Kl. I **133**, 265—290 (1924). — Hartig, Th.: Bot. Ztg **1859**. Zit. nach Sanio. — Lange, Th.: Beiträge zur Kenntnis der Entwicklung der Gefäße und Tracheiden. Flora (Marburg) **74** (49), 391—434 (1891). — Luehr, W.: Ein Beitrag zur Kenntnis der Vorgänge in sich differenzierenden und streckenden Pflanzenzellen. Bot. Arch. **21**, 116—216 (1928). — Mühlethaler, K.: Elektronenoptische Untersuchungen an pflanzlichen Geweben. Z. Zellforsch. **38**, 299—327 (1953). — Münch, E.: Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Jena 1930. — Phillis, E., and T. G. Mason: The polar distribution of sugar in the foliage leaf. Ann. of Bot. **47**, 585 (1933). — Preston, R. D.: Movement of water in higher plants. In Frey-Wyssling, Deformation and flow in biological sy-

stems. Amsterdam 1952. — Renner, O.: Die Porenweite der Zellhäute in ihrer Beziehung zum Saftsteigen. Ber. dtsch. bot. Ges. **43**, 207—211 (1925). — Hydrostatischer Druck und Gasgehalt. Ber. dtsch. bot. Ges. **60**, 292—294 (1942). — Resch, A.: Beiträge zur Cytologie des Phloems. Entwicklungsgeschichte der Siebröhrenglieder und Geleitzellen bei *Vicia faba* L. Planta (Berl.) **44**, 75—98 (1954). — Sanio, C.: Vergleichende Untersuchungen über die Elementarorgane des Holzkörpers. Bot. Ztg **21**, 85—91, 93—98, 121—128 (1863). — Schwendener, S.: Untersuchungen über das Saftsteigen. Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss. Berlin **1886**. Zit. nach Ursprung. — Strasburger, E.: Über den Bau und die Verrichtungen der Leitungsbahnen in den Pflanzen. Histologische Beiträge Heft 3. Jena 1891. — Ursprung, A.: Wasserhaushalt der Pflanzen. In Handwörterbuch der Naturwissenschaft, Bd. 10, S. 548—562. Jena 1935. — Vöchting, H.: Über die Lichtstellung der Laubblätter. Bot. Ztg **46**, 501—514 (1888). — Zimmermann, A.: Die Cucurbitaceen. Beiträge zur Anatomie, Physiologie, Morphologie, Biologie, Pathologie und Systematik. Jena 1922.

Dr. Armin Resch, Botanisches Institut, Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9.

Planta, Bd. 45, S. 325—375 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn.

ZUR PHYSIOLOGIE DER ACRIDINORANGE-WIRKUNG. UNTERSUCHUNGEN AN HEFEZELLEN.

Von

HANS JOACHIM BOGEN und ULRICH ELSTE.

Mit 23 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Januar 1955.)

I. Einleitung.

Mit dem fluorescierenden Farbstoff Acridinorange, dessen Einführung wir BUKATSCH und HAITINGER (1940) und STRUGGER (1940; 1949 siehe dort weitere Literatur) verdanken, gelingt es, Zellen von Bakterien, niederen und höheren Pflanzen rot oder grün zu fluorochromieren. STRUGGER glaubte, daß die Grünfluorescenz auf lebende Zellen beschränkt sei, während Rotfluorescenz den Zelltod anzeige. Demgegenüber konnte BOGEN (1953) an Hefezellen zeigen, daß über die Fluorescenzfarbe nicht so sehr der Lebenszustand entscheidet als vielmehr die Suspensionsdichte und andere physikalische Faktoren. Das heißt also, daß bei hoher Suspensionsdichte auch tote Hefezellen nur grün fluorochromiert werden, bei geringer Suspensionsdichte hingegen lebende Zellen rot fluorescieren. Über diese Feststellung hinaus, nach der sich die Verwendung der Acridinorange-Methode als Test für den Lebenszustand der Hefezellen (STRUGGER) künftig verbietet, konnten zwei weitere Faktoren erfaßt werden: 1. Der physiologische Zustand der lebenden Zellen kann das Färbeergebnis erheblich modifizieren (BOGEN 1953) und 2. das Acridinorange ist kein unschädlicher Farbstoff, sondern vermag Hefezellen in kürzester Zeit abzutöten, bei gleichzeitigem Abbau eines großen Teiles der Zellproteine (BOGEN und KESER 1954). Damit verändert auch das Fluorochrom selbst den physiologischen Zustand und die Färbemöglichkeiten.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch Veränderung des physiologischen Zustandes von Hefezellen weiter zu untersuchen, inwiefern dieser das Färbeergebnis und zugleich die Angriffsmöglichkeiten des Zellgiftes modifiziert.

In ihrem ersten Teil wird versucht, den physiologischen Zustand der Zellen durch Variation der äußeren Bedingungen (verschiedene Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit, Belüftung, Zusatz von Stoffwechselgiften u. a.) bei Bäckerhefe und einer daraus isolierten Reinhefe zu verändern und den Einfluß dieser Änderung auf die Anfärbung zu

kontrollieren. Die Ergebnisse werden den unter gleichen Bedingungen gewonnenen Resultaten über die Beeinflussung des Wachstums durch Acridinorange gegenübergestellt. Im zweiten Teil der Arbeit soll die Wirkung des Farbstoffes auf den Stoffwechsel der Hefen durch Messung des Proteinabbaus und des Gasaustausches einer Analyse unterzogen werden.

Wie bereits oben angeführt wurde, greifen die Untersuchungen über die physiologischen Bedingungen für die Anfärbung und die durch den Farbstoff hervorgerufenen Änderungen des physiologischen Zustandes der Zellen ineinander. Dabei nehmen die Wachstumsversuche eine Mittelstellung ein, da sie nicht allein der Analyse der Anfärbung unter verschiedenen Wachstumsbedingungen dienen, sondern auch die Beeinflussung dieses Wachstums durch Acridinorange anzeigen. Insofern lassen sich die Ergebnisse nicht scharf in die beiden oben angeführten Versuchsgruppen trennen, wie es hier aus Gründen der besseren Übersicht versucht wird.

II. Experimenteller Teil.

A. Methodisches.

1. Versuchsmaterial.

a) Bäckerhefe wurde jeweils frisch vom Lieferanten bezogen und im Eisschrank bei + 2°C gelagert. Sie wurde in einer feuchten Petri-Schale höchstens eine Woche lang aufbewahrt; Unterschiede in der Lagerungsdauer waren innerhalb dieses Zeitraumes ohne Einfluß auf die Versuchsergebnisse.

b) Reinhefe. Aus dieser Bäckerhefe wurde durch sterile Ausspatelung einer Kulturprobe (s. unten) auf Nähragar eine Reinkultur hergestellt. Sie erwies sich bei mikroskopischer Kontrolle als frei von Bakterien und anderen Hefen.

2. Suspensionsflüssigkeiten.

a) Destilliertes Wasser. Verwendet wurde immer doppelt destilliertes Wasser, davon einmal über Quarz.

b) Leitungswasser. Marburger Leitungswasser wurde abgekocht und über Nacht stehen gelassen.

c) Glucoselösung. 1% Glucose in Leitungswasser.

d) Nährlösung nach SCHOPFER. 0,5 g $MgSO_4$, 1,5 g KH_2PO_4, 1 g Asparagin und 50 g Glucose auf 1000 ml doppelt destilliertes Wasser.

e) Unvollständige Nährlösung. 1—3 Bestandteile der Nährlösung nach SCHOPFER wurden wechselweise weggelassen.

f) Nährlösung mit verschiedenen N-haltigen Nährstoffen enthielt N in gleichem molaren Verhältnis als Asparagin (1‰), Ammoniumsulfat (0,9‰), Kaliumnitrat (1,35‰) oder Harnstoff (0,4‰). Die übrigen Bestandteile sind die gleichen wie in der Nährlösung nach SCHOPFER.

g) (Agarplatten enthielten Nährlösung nach SCHOPFER + 2% Agar, s. S. 328.)

3. Verwendete Substanzen.

Acridinorange „für Mikroskopie und Bakteriologie" (Merck) (s. S. 337).
Ammoniumsulfat, $(NH_4)_2SO_4$ (Merck, p. a.).
Asparagin (Merck, ohne Angabe des Reinheitsgrades).
Glucose (Dextropur, handelsüblich).
Harnstoff (Merck, kristallisiert, reinst).
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 (Merck, p. a.).
Magnesiumsulfat, $MgSO_4$ (Merck, p. a.).
Natriumazid, NaN_3 (Merck, ohne Angabe des Reinheitsgrades).

4. Suspensionen.

a) Bäckerhefe. Zur Herstellung einer Hefesuspension wurde Bäckerhefe nach der Aufbewahrung im Eisschrank abgewogen und in dem jeweils angegebenen Suspensionsmittel durch Schütteln verteilt. Die Suspensionsdichte (S.D.) wird angegeben als g Hefe/x ml Suspensionsmittel: z. B. 1:200 = 1 g Hefe in 200 ml Suspensionsmittel.

b) Reinhefe. Eine Probe der Reinhefe wurde in Nährlösung nach SCHOPFER übergeimpft und 4 Tage lang unter Belüftung zu einer Kultur herangezogen. Dann wurde die Hefe von der Nährlösung abzentrifugiert, mehrfach mit Aq. dest. ausgewaschen, in destilliertem Wasser suspendiert und erneut unter Belüftung 24 Std lang stehengelassen, d. h. bis zur vollständigen Veratmung der noch vorhandenen Glucose. Anschließend wurde wieder zentrifugiert, die Hefe mehrfach mit Aq. dest. ausgewaschen, eine Stammsuspension in destilliertem Wasser hergestellt und deren Suspensionsdichte durch Auszählen unter dem Mikroskop ermittelt. Die Aufschwemmung wurde im Eisschrank aufbewahrt.

Für Versuchszwecke wurde diese Suspension soweit mit dem entsprechenden Suspensionsmittel verdünnt, bis die durch Auszählen ermittelte Zellzahl je Kubikmillimeter derjenigen einer Aufschwemmung aus Bäckerhefe mit der gleichen S.D. entsprach, z. B. bei 1:200 = $5{,}2 \cdot 10^4$ Zellen/mm³.

c) Behandlung der Suspensionen. Ruhende Suspensionen wurden in einem (mit Wattestopfen verschlossenen) Erlenmeyer-Kolben bei 25°C im Luftthermostaten aufbewahrt. Bei unbewegten, belüfteten Suspensionen wurde ein lebhafter Strom wattegefilterter Luft durch die Flüssigkeit geleitet. Die Raumtemperatur betrug 15—20° C. Bei Schüttelversuchen wurden die Kolben in eine Anzuchtanlage (nach PIRSON, TICHY und WILHELMI 1952) eingesetzt und ohne Belüftung mit einer Frequenz von etwa 100/min und einer Amplitude von 10 cm horizontal bewegt. Die Temperatur betrug 25° C.

5. Fluorochrom.

Acridinorange (AO). 0,1 g AO wurde in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und diese Standardlösung jeweils im Verhältnis 1:10 mit der betreffenden Hefesuspension vermischt. Die Versuchskonzentration betrug immer 0,01% AO (= „1:10000"). Die Stammlösung wurde mindestens einmal wöchentlich erneuert und im Dunkeln aufbewahrt. Der p_H-Wert der Lösung (p_H 3,8) blieb innerhalb der Aufbewahrungszeit unverändert. Das vorliegende AO ist das Chlorzinkdoppelsalz des Farbstoffes und enthält $BaCl_2$ als sog. Stellsalz. Aus einer Elementaranalyse wurde folgende Zusammensetzung berechnet:

Acridinorange	29,8%,
$ZnCl_2$	15,3%,
$BaCl_2$	54,9%.

Der Acridinstickstoff wurde bei der Mikro-Kjeldahl-Methode vollständig erfaßt (BOGEN und KESER 1954).

6. Die Kontrolle der Fluorescenz

erfolgte mit dem Zeiss-Winkel-Standardmikroskop entweder mit einer Bogenlampe als Lichtquelle oder mit dem Hg-Höchstdruckbrenner der Fa. Zeiss-Winkel, Blaufilter BG 1,2 mm dick (Schott u. Gen.), Okularsperrfilter Orangefilter OG 1 bzw. OG 4 (Schott u. Gen.). Zur Erzielung reproduzierbarer Auszählungsergebnisse wurden bei jeder Messung in den ersten Versuchen 10 Gesichtsfelder von 3 verschiedenen Präparaten jeder Probe, später, wenn immer es die zum Auszählen zur Verfügung stehende Zeit erlaubte, 21 Gesichtsfelder von 7 Präparaten jeder Probe

ausgezählt. Jedes Gesichtsfeld sollte 100—150 Zellen enthalten. Die Dauer der Messung betrug durchschnittlich 10—15 bzw. 25—30 min, d. h. 1—1,5 min für jedes Gesichtsfeld. Auf diese Weise konnte eine Schädigung durch Blaulicht gering gehalten werden.

7. Die Messung der Suspensionsdichte

erfolgte in der von Bogen (1953) beschriebenen Weise.

8. Plattenversuche

dienten zur Bestimmung der Überlebendenrate. Unter möglichst sterilen Bedingungen wurde eine Probe (0,5—1 ml) der Versuchslösung mit Aq. dest. soweit verdünnt, bis die S.D. 4 · 10^3 Zellen/mm^3 betrug (d. h. durchschnittlich 16 Zellen je Großquadrat der Thoma-Zählkammer). Diese Probe wurde in 4 Stufen (1:10, 1:10, 1:10 und 1:2) mit destilliertem Wasser weiter verdünnt, unter längerem kräftigen Schütteln im Reagenzglas. Die Endkonzentration betrug dann 2 Zellen je Kubikmillimeter. Davon wurde jeweils 0,1 ml auf Nähragar ausgespatelt. So waren auf jeder Petri-Schale (10 cm ⌀) rund 200 Kolonien zu erwarten. Die Platten wurden 3—5 Tage lang bei 25° C im Luftthermostaten bebrütet, die gebildeten Kolonien anschließend unter einem binokularen Präpariermikroskop ausgezählt. Es wurden 10—12 Petri-Schalen parallel beimpft und jeder Versuch mindestens 6mal wiederholt.

Verunreinigungen durch andere Pilze und Bakterien, die schon in der Versuchslösung enthalten sein können, sind nicht auszuschließen. Indessen wachsen die (an das Nährmedium adaptierten) Reinhefen schneller als andere Pilze und, infolge des p_H-Wertes des Nährbodens (p_H 4,5), auch schneller als die meisten Bakterien. Ein rechtzeitiges Auszählen wird also von Verunreinigungen dieser Art nicht beeinträchtigt.

9. Die Bestimmung der Farbstoffmenge

in der Suspensionsflüssigkeit nach dem Abzentrifugieren der Hefe (sog. „Restfarbstoff") geschah mit dem Photometer nach Pulfrich. Aus den gemessenen Extinktionswerten wurde die Farbstoffmenge mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt. Die verwendeten Spektralfilter waren für AO in Wasser S 47 und für AO in 70%igem Alkohol S 50.

10. Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration

erfolgte mit der Chinhydronelektrode und dem Ionometer nach Lautenschläger.

11. Quantitative Stickstoffbestimmungen

nach Kjeldahl (vgl. Bogen und Keser 1954) mit der Destillationsapparatur der Fa. Keiner, Hamburg: 0,2 g Bäckerhefe wurde in 40 ml (S.D. 1:200) oder 100 ml (1:500) Suspensionsmittel verteilt. Nach der jeweils angegebenen Zeit wurde zentrifugiert (30 min bei 5000 U/min), die Suspensionsflüssigkeit vorsichtig eingedunstet, die abzentrifugierte Hefe 24 Std bei 80° getrocknet, ihr Trockengewicht bestimmt und sie anschließend mit Seesand verrieben, bis bei der mikroskopischen Kontrolle keine intakten Zellwände mehr zu erkennen waren. Die zerkleinerte Hefe wurde mit 25 ml 70%igem Alkohol unter häufigem Umschütteln 24 Std lang bei Zimmertemperatur extrahiert. Danach wurde wieder zentrifugiert (30 min bei 5000 U/min) und aus der überstehenden Lösung der Alkohol vertrieben. Der N-Gehalt aller 3 Fraktionen wurde nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt

(Veraschung und Destillation wurden nach dem Verfahren von KLINGMÜLLER 1952, Titration nach der Borsäuremethode ausgeführt). Die N-Mengen lagen zwischen 0,02 und 0,3 mg. Vor dem Eindunsten der Suspensionsflüssigkeit und des Alkoholauszuges wurde der Farbstoffgehalt in beiden photometrisch gemessen.

12. Manometrische Gaswechselbestimmungen

dienten zur Ermittlung des von der Hefe im Laufe des Versuches aufgenommenen O_2 bzw. abgegebenen CO_2. Zur Anwendung kam die ±KOH-Methode (UMBREIT, BURRIS und STAUFFER 1947, DIXON 1951). Gearbeitet wurde mit 3 Parallelen. Das Volumen der Gefäße betrug 29,55—30,95 ml. Die Gefäße wurden bei 25° C mit einer Frequenz von 100/min und einer Amplitude von 4—5 cm horizontal geschüttelt. Abgelesen wurde nach 15, 20 oder 30 min. Die Ausschläge der Manometer betrugen durchschnittlich 30 mm.

Um Ausschläge gleicher Größenordnung zu erhalten, mußte bei den verschiedenen Suspensionsdichten mit verschiedenen Mengen an Suspensionsflüssigkeiten gearbeitet werden. Die Gefäße wurden beschickt bei 1:200 mit 2,7 ml einer Suspension von 0,5 g Hefe in 90 ml 1%iger Glucoselösung, bei 1:500 mit 5,7 ml einer Suspension von 0,2 g Hefe in 95 ml 1%iger Glucoselösung.

Die Ansätze enthielten dementsprechend bei

1:200 0,3 ml einer 0,1%igen AO-Lösung bzw. 0,3 ml NaN_3-Lösung (10^{-2} mol),
1:500 0,3 ml einer 0,2%igen AO-Lösung

und bei den Kontrollen beider Suspensionsdichten 0,3 ml Aq. dest. Die zur Ermittlung der O_2-Aufnahme bestimmten Gefäße enthielten zusätzlich 0,3 ml 20%ige KOH. Nach dem Einsetzen der Gefäße in den Thermostaten wurden sie 50 min lang geschüttelt, bis die Ausschläge der Manometer bei allen Gefäßen konstant waren, und dann deren Inhalt mit den im Ansatz befindlichen Zusätzen vermischt.

Da die Versuche unter den gleichen Bedingungen wie bei den anderen Versuchsgruppen durchgeführt werden sollten, konnte nicht in gepufferten Lösungen gearbeitet werden, zumal bei einem Kontrollversuch mit $^1/_{20}$ mol KH_2PO_4-Lösung als Puffer wesentlich andere Ergebnisse erhalten wurden, als ohne Anwendung eines Puffers.

Die Anwendung ungepufferter Suspensionsflüssigkeiten ist insofern berechtigt, als die p_H-Änderungen in den Versuchslösungen mit AO und in den Kontrollen ohne AO innerhalb der Versuchszeit gleich waren (von 6,3 auf 5,3 bei 1:500 und von 6,3 auf 4,8 bei 1:200).

Nach jedem Versuch wurde nach dem Abzentrifugieren der Hefe der p_H-Wert und der Farbstoffgehalt der Versuchslösung gemessen.

13. Statistik.

Die statistische Auswertung der Versuche über die Anfärbung und das Wachstum wurde mit Hilfe eines von GEBELEIN und HEITE (1951) angegebenen Schemas vorgenommen.

Ermittelt wurden der Mittelwert und die Standardstreuung als mittlere quadratische Abweichung des Mittelwertes. Die relative Streuung lag zwischen ± 2.6 und 12,9%, in der Regel bei ±5,2%. Die höheren Werte finden sich vor allem beim Auftreten sog. „Oberflächenhefen", da sich diese Hefen schlecht durch Schütteln in der Flüssigkeit verteilen lassen.

14. Abkürzungen.

AO = Acridinorange. S.D. = Suspensionsdichte.
Aq. dest. = doppelt destilliertes Wasser. Std = Stunden.

B. Versuchsergebnisse.

Die von Bogen (1953) beschriebenen Versuche hatten bei gleicher Farbstoffkonzentration eine Anfärbung der Hefezellen in Abhängigkeit von der Suspensionsdichte ergeben: Bei hoher S.D. ($3{,}2 \cdot 10^5$ Zellen/mm³ und mehr) konnte auch nach 24stündiger Anfärbung keine wesentliche Erhöhung des zu Versuchsbeginn vorhandenen Prozentsatzes rotfluorochromierter Zellen mehr erzielt werden, während bei geringer S.D. ($2 \cdot 10^4$ Zellen/mm³ und weniger) nach 8 Std bereits 100% der Zellen rot fluorescierten.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher das Interesse hauptsächlich auf den „kritischen Bereich" zwischen $1{,}3 \cdot 10^4$ Zellen/mm³ (S.D. 1:800) und $2{,}1 \cdot 10^5$ Zellen/mm³ (S.D. 1:50) gerichtet und die meisten Untersuchungen bei der mittleren S.D. 1:200 (= $5{,}2 \cdot 10^4$ Zellen/mm³) ausgeführt.

1. Die Kontrolle der Anfärbung.

a) Die Anfärbung von Bäckerhefe in Leitungswasser. α) Eine Hefesuspension wurde im Verhältnis 1:200 in Leitungswasser mit AO 1:10000 angesetzt und die Fluorescenz der Zellen nach 10 min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 24 Std festgestellt.

Bereits Strugger (1944) unterschied zwischen verschiedener Anfärbung von Zellmembran, Cytoplasma, Vacuole, Kern, Chromosomenäquivalenten und cytologisch nicht genau bestimmbaren Einschlüssen. Da die in jener Arbeit herausgestellte Unterscheidung von toten und lebenden Zellen im wesentlichen nur von der Fluorochromierbarkeit des *Plasmas* abhängen sollte, untersuchte Bogen (1953) nur die rote und grüne Plasmafärbung. Um eine weitergehende Differenzierung zu ermöglichen, wurde hier zwischen 3 Zellgruppen unterschieden:

1. Zellen mit grüner Plasmafluorescenz, der gesamte Protoplast fluoresciert dunkel- bis gelbgrün.

2. Zellen mit grüner Fluorescenz des „Grundplasmas" und gelb- bis rotfluorescierenden Einschlüssen.

3. Zellen mit gelber bis roter Plasmafluorescenz. Dabei können in dem so gefärbten Plasma noch intensiver fluorescierende Einschlüsse vorhanden sein (s. unten).

Für Versuchszwecke erscheint diese Einstellung ausreichend. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß innerhalb einer Gruppe unter verschiedenen Versuchsbedingungen auch sehr unterschiedliche Anfärbungen erfaßt werden können, soweit es die Qualität und Intensität der Farbe betrifft.

Die Anfärbung in Leitungswasser vollzieht sich, in Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen, in der Regel nach folgenden Stufen:

1. Grün- bis Rotfärbung der Membran. Sie ist meist nur unmittelbar nach Versuchsbeginn erkennbar und kann teilweise überhaupt ausbleiben; sie wurde daher bei den quantitativen Messungen vernachlässigt.

2. Grünfärbung des Plasmas und Rückgang der Membranfärbung.

3. Gleichzeitig oder wenig später treten gelbe bis rote Einschlüsse im grün fluorescierenden Plasma auf, deren Färbung sich unter Umständen im Laufe der

Zeit vertieft. Die Einschlüsse sind an Gestalt, Farbe und Anzahl nicht gleichwertig. Auch Vacuolen können gefärbt sein. Über die Natur der Einschlüsse können keine sicheren Aufschlüsse gegeben werden. Einmal ist über die Cytologie der Hefezellen noch zu wenig Gesichertes bekannt, als daß eine eindeutige Differenzierung von Zellkern, Mitochondrien, Mikrosomen und möglicherweise noch anderen Körpern vorgenommen werden könnte; andererseits reichen die Beobachtungszeit und die für die Fluorescenzmikroskopie zur Verfügung stehenden Hilfsmittel zur Zeit noch nicht aus, um bei der Kleinheit der Hefezelle zu der für eine statistische Auswertung notwendigen Anzahl von Meßergebnissen zu kommen. Bei Verwendung einer Ölimmersion ist einmal das Gesichtsfeld so klein, daß nur wenige Hefezellen zur gleichen Zeit beobachtet werden können; zum anderen muß die Intensität der Beleuchtungsquelle so stark sein, daß schon in kurzer Zeit Lichtschädigungen auf-

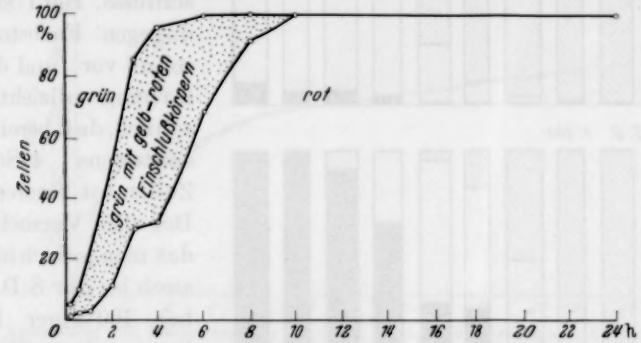


Abb. 1. Anfärbung von Bäckerhefe in Leitungswasser, S. D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz roter Zellen, grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen und rein grüner Zellen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Der punktierte Bereich zwischen beiden Kurven gibt den Anteil der grünen Zellen mit Einschlußkörpern wieder.

treten, wie z. B. die Auflösung von Einschlußkörpern und damit verbunden eine intensivere Plasmafärbung u. ä.

4. Das Plasma färbt sich gelbgrün bis orange. Die Einschlüsse sind dann nicht mehr differenzierbar.

5. Das Plasma ist feuer- bis dunkelrot fluorochromiert und „destruiert".

In Abb. 1 erkennt man das prozentuale Verhältnis der 3 Anfärbungsgruppen und den Anstieg der Rotfluorescenz bzw. die Abnahme der Grünfluorescenz in Abhängigkeit von der Zeit, d. h. von der Einwirkungsdauer des Farbstoffes. 10 min nach Versuchsbeginn stellt man etwa 95% grüner Zellen, ferner 4% Zellen mit gelbroten Einschlüssen und 1% roter Zellen fest. Später nimmt die Zahl der Zellen mit Einschlüssen schnell zu, die der rotfluorochromierten langsamer. In der graphischen Darstellung ergeben sich 2 „Sättigungskurven", die zeitlich gegeneinander verschoben sind.

Der Versuch zeigt, daß bei einer Suspension von Bäckerhefe in Leitungswasser, S.D. 1:200, mit AO alle Zellen rotfluorochromierbar sind, und daß der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen von der Einwirkungsdauer des Farbstoffes abhängig ist.

β) In gleicher Weise wurde auf die Anfärbung der Zellen in 3 verschiedenen S.D. geprüft (1:50, 1:200 und 1:800). Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

Bei 1:50 herrscht Farbstoffmangel; nach 24 Std sind daher höchstens 10% der Zellen rot fluorochromiert. Dieser Prozentsatz erhöht sich auch nach weiteren 24 Std nicht mehr. — 8—10 Std nach Versuchsbeginn haben fast alle übrigen Zellen gelbe bis rote Einschlüsse. Bei 1:800 liegt dagegen Farbstoffüberschuß vor, und die Anfärbung vollzieht sich so schnell, daß bereits nach spätestens 4 Std alle Zellen rot fluorescieren. Bei allen Versuchen findet man jedoch hier, wie auch bei der S.D. 1:200, bei 100%iger Rotfärbung gelegentlich eine oder wenige grüne Zellen.

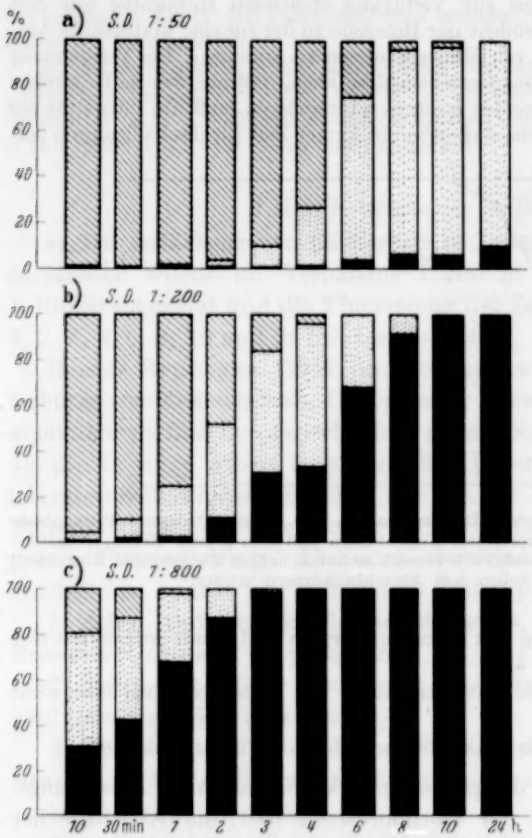


Abb. 2 a—c. Anfärbung von Bäckerhefe in Leitungswasser, S.D. 1:50 (a), 1:200 (b) und 1:800 (c). Erklärungen siehe Abb. 6.

Die Ergebnisse stimmen mit den Befunden BOGENS (1953) überein, wonach praktisch alle Zellen rot fluorochromierbar sind, und daß bei gegebener Farbstoffkonzentration die Anfärbung von der Suspensionsdichte und der Anfärbungszeit abhängt.

b) Die Anfärbung von Bäckerhefe in destilliertem Wasser. Da BOGEN (1953) als Suspensionsmittel Aq.dest. verwendet hatte, sollte nunmehr das Färbeverhalten der Bäckerhefe in destilliertem Wasser untersucht werden.

Bäckerhefe wurde 1:200 in Aq.dest. suspendiert, mit AO gefärbt und die Fluorescenz nach 30 min, 2, 4, 6, 8, 24 und 48 Std kontrolliert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 eingetragen.

Der Prozentsatz roter Zellen ist zu Anfang wesentlich höher als in Leitungswasser, nach $^1/_2$ Std beträgt er 27% anstatt 1—2%. Nach

6 Std ist er aber bereits *geringer* und erreicht innerhalb von 24 Std nur 70—75%. Diese Zahl bleibt auch nach 48stündiger Anfärbung erhalten. *100%ige Rotfärbung findet im Gegensatz zum Leitungswasser nicht statt.* Die nicht rot fluorescierenden Zellen sind grün gefärbt. Auffällig ist ferner, daß nur wenige Zellen mit gelbroten Einschlüssen auftreten und zwar nur zu Beginn des Versuches.

Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden Bogens, der bei der gleichen Hefekonzentration nach 48 Std 75% rotfluorochromierbarer Zellen fand. Es zeigt weiterhin, daß die An-

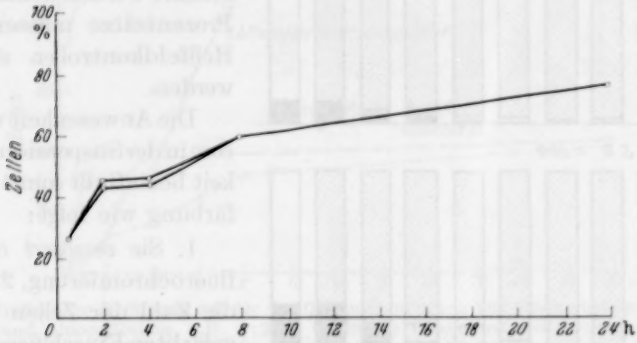


Abb. 3. Anfärbung von Bäckerhefe in Aq. dest. S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz roter Zellen, grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen und rein grüner Zellen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

färbung (außer von der Einwirkungs*dauer* des Farbstoffes und von der Suspensions*dichte*) auch vom Suspensions*mittel* abhängt.

c) Die Anfärbung der Bäckerhefe in Glucoselösung. In den folgenden Untersuchungen wurde nunmehr versucht, den physiologischen Zustand der Hefezellen durch eine unterschiedliche Anregung des Stoffwechsels zu verändern. Zu diesem Zwecke wurde die Hefe zunächst in 1%iger Glucoselösung (Leitungswasser) suspendiert, und zwar in den gleichen Verdünnungsstufen 1:50, 1:200 und 1:800 (wie unter 1a).

Die Ergebnisse sind in Abb. 4 eingezeichnet.

a) Der Prozentsatz rotfluorescierender Zellen ist in gleichem Sinne wie bei den Leitungswasserversuchen von der Suspensionsdichte abhängig. Die Rotfluorescenz tritt jedoch *verzögert* ein (s. Abb. 6).

b) Grüne Zellen mit gelbroten Einschlüssen sind zu Versuchsbeginn vorhanden, und zwar bei 1:800 in größerer Anzahl als bei 1:200 oder 1:50. Nach 4 Std nimmt ihre Zahl ab und nach 24 Std sind Einschlüsse meist nicht mehr erkennbar. Die Summe rotfluorescierender Zellen und solcher mit Einschlüssen erreicht aber bei 1:200 niemals den Wert von 100%, wie bei Leitungswasser allein, sondern strebt einem bestimmten *geringeren* Wert zu, der seinerseits ebenfalls von der Suspensionsdichte

abhängt und bei 1:200 ungefähr 40% (roter Zellen) beträgt. Dieser Wert bleibt dann ziemlich konstant; er steigt in den nächsten 24 Std meist nur noch unerheblich an.

c) Bei den grünen Zellen macht sich bereits nach 24 Std eine *Entfärbung* bemerkbar. Diese ist nach weiteren 24 Std so weit fortgeschritten, daß diese Zellen im Fluorescenzmikroskop nicht mehr sichtbar sind, und daß daher nur noch rote Zellen ausgezählt werden können. Die Prozentsätze müssen durch Hellfeldkontrollen ermittelt werden.

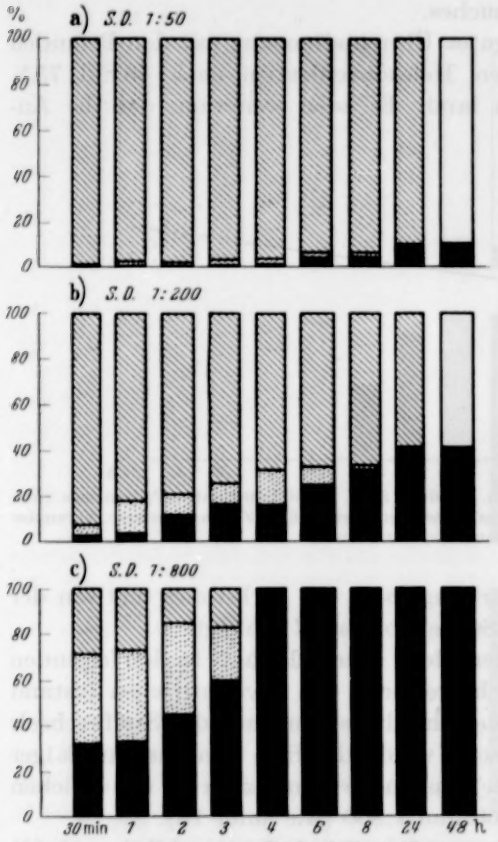


Abb. 4a—c. Anfärbung von Bäckerhefe in Glucoselösung, S.D. 1:50 (a), 1:200 (b) und 1:800 (c). Erklärungen siehe Abb. 6.

Die Anwesenheit von Glucose in der Suspensionsflüssigkeit beeinflußt somit die Anfärbung wie folgt:

1. Sie *verzögert* die Rotfluorochromierung, 2. sie *setzt* die Zahl der Zellen mit angefärbten Einschlüssen *herab*, 3. sie *verhindert* eine 100%ige Rotfärbung und 4. sie führt zur *Entfärbung* grüner Zellen.

d) Die Anfärbung von Bäckerhefe in durchlüfteten Suspensionen. Da bei untergärigen Hefen durch aerobe Bedingungen eine Atmung (unter adaptiver Enzymbildung) induziert werden kann (vgl. EPHRUSSI und SLONIMSKI 1950), ist ein weiteres Mittel gegeben, den Kohlenhydratstoffwechsel und damit den physiologischen Zustand zu verändern.

α) Durch eine Suspension von Bäckerhefe, 1:200 in Glucoselösung, wurde während der ganzen Versuchsdauer wattegefilterte Luft in kräftigem Strom hindurchgeleitet. AO-Zusatz erfolgte sofort, nach 2 und 4 Std. Als Kontrolle diente eine Suspension ohne Glucose mit sofortiger Zugabe von AO.

Abb. 5 zeigt, daß Belüftung die Rotfärbung stark beschleunigt, und zwar sowohl in Leitungswasser als auch in 1%iger Glucoselösung.

Aus Abb. 6 ist ferner zu ersehen, daß $^1/_2$ Std nach Versuchsbeginn der Prozentsatz roter Zellen um so *höher* ist, je später AO dem Versuch hinzugefügt wurde.

Der Prozentsatz der Zellen mit gefärbten Einschlußkörpern steigt am Anfang des Versuches sehr stark an, geht dann aber wieder zurück und ist nach 24 Std nur noch sehr gering. Der Rückgang wird um so mehr beschleunigt, je später AO dem Versuch hinzugefügt worden ist. 30 min

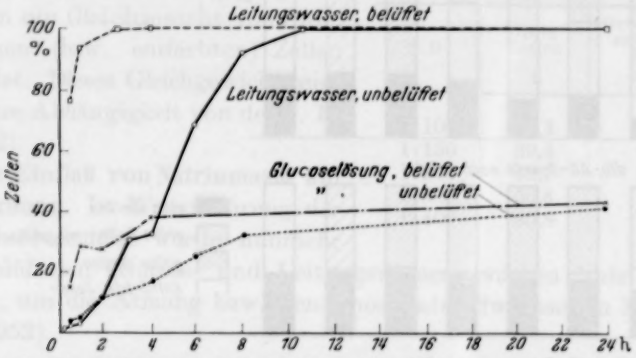


Abb. 5. Einfluß der Belüftung auf die Rotfluorochromierung von Bäckerhefe in Leitungswasser und Glucoselösung. S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

nach AO-Zugabe zur Versuchslösung wurden folgende Prozentzahlen ermittelt (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Prozentsatz roter Zellen und grüner Zellen mit gelb-roten Einschlußkörpern 30 min nach AO-Zusatz.* Anfärbung von Bäckerhefe in belüfteter Glucoselösung, S.D. 1:200. AO-Zugabe zu Versuchsbeginn, nach 2 und 4 Std.

AO-Zugabe	Rotfluorochromierte Zellen %	Grüne Zellen mit gelbroten Einschlüssen %
Zu Versuchsbeginn	14,9	25,8
2 Std nach Versuchsbeginn . .	31,2	15,4
4 Std nach Versuchsbeginn . .	38,8	7,1

Zwischen roten und grünen Zellen stellt sich auch hier nach spätestens 24 Std *das gleiche Zahlenverhältnis* ein *wie bei den unbelüfteten Versuchen*, nämlich 40% rote und 60% grüne (bzw. entfärbte) Zellen (s. S. 334), d. h. es findet hier die gleiche Entfärbung der grünen Zellen statt wie bei Verwendung des gleichen Suspensionsmittels ohne Belüftung.

β) In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Suspensionsdichte variiert und Aufschwemmungen in den Verhältnissen 1:100, 1:150, 1:200, 1:300 und 1:400 hergestellt und sofort mit AO versetzt.

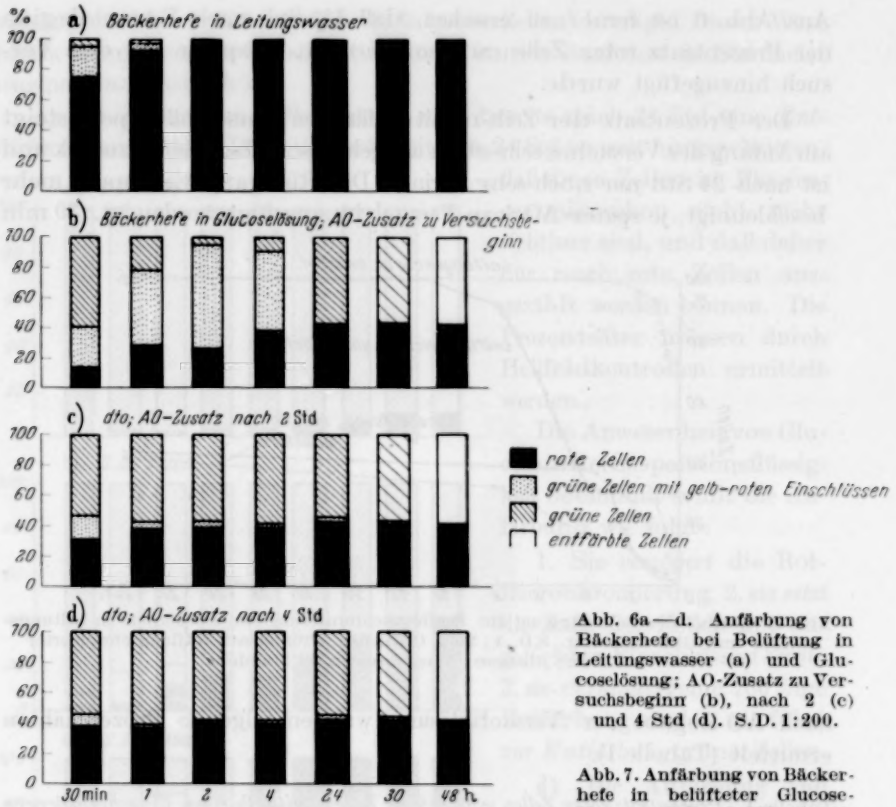


Abb. 6a—d.

Abb. 6a—d. Anfärbung von Bäckerhefe bei Belüftung in Leitungswasser (a) und Glucoselösung; AO-Zusatz zu Versuchsbeginn (b), nach 2 (c) und 4 Std (d). S.D. 1:200.

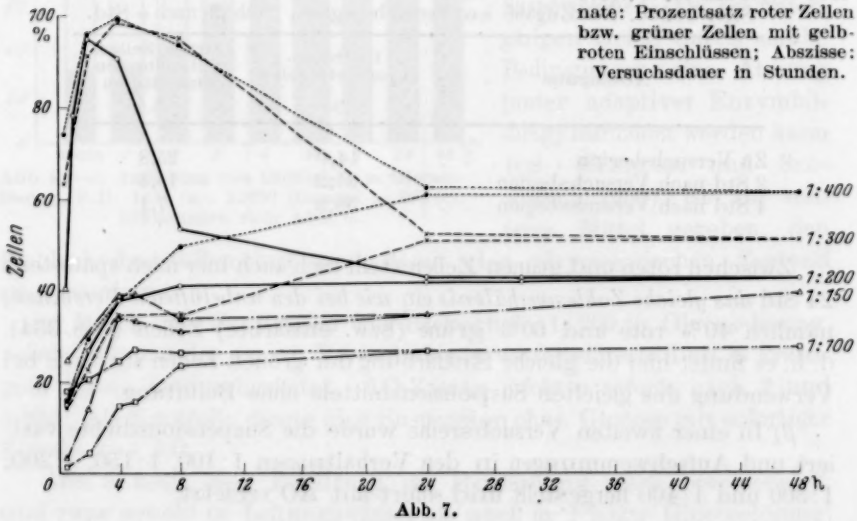


Abb. 7.

Abb. 7. Anfärbung von Bäckerhefe in belüfteter Glucoselösung, S.D. 1:100, 1:150, 1:200, 1:300 und 1:400. Ordinate: Prozentsatz roter Zellen bzw. grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

Aus Abb. 7 ist die *Abhängigkeit der Anfärbung von der Suspensionsdichte zu ersehen.* Besonders auffällig ist die Zahl der Zellen mit Einschlüssen. Deren prozentualer Anstieg ist um so größer und der Rückgang um so mehr verzögert, je geringer die Suspensionsdichte ist.

Nach 24 Std hat sich bei allen Ansätzen wie bei den vorausgegangenen Versuchen ein Gleichgewicht von roten und grünen (bzw. entfärbten) Zellen ausgebildet. Dieses Gleichgewicht zeigt eine lineare Abhängigkeit von der S. D. (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Abhängigkeit des Zahlenverhältnisses roter:grüner Zellen von der S.D.* Anfärbung von Bäckerhefe in belüfteter Glucoselösung. Auszählung 48 Std nach Versuchsbeginn.

S.D.	Rote Zellen %	Grüne (bzw. entfärbte) Zellen %
1:100	28,3	71,7
1:150	39,4	60,6
1:200	42,7	57,3
1:300	50,8	49,2
1:400	60,8	39,2

e) Der Einfluß von Natriumazid auf die Anfärbung. In Weiterführung der Stoffwechselversuche wurde nunmehr den unbelüfteten Glucose- und Leitungswasserversuchen Natriumazid zugesetzt, um die Atmung bzw. den Phosphatstoffwechsel zu hemmen (Fales 1953).

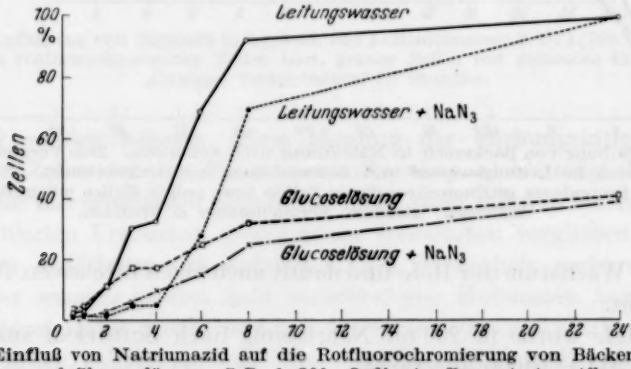


Abb. 8. Einfluß von Natriumazid auf die Rotfluorochromierung von Bäckerhefe in Leitungswasser und Glucoselösung. S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

Dazu wurden die 3 S.D. 1:50, 1:200 und 1:800 in Leitungswasser und 1%iger Glucoselösung mit AO und NaN_3 (10^{-3} mol) versetzt. Die Versuche wurden variiert, indem zunächst AO und NaN_3 gleichzeitig zu Versuchsbeginn zugesetzt wurden, AO zu Anfang und NaN_3 30 min später und NaN_3 sofort und AO 30 min später.

In allen Fällen ist eine erhebliche *Verzögerung der Rotfärbung* festzustellen (hierzu Abb. 8, für die S. D. 1:200 in Leitungswasser und Glucoselösung). Zugleich ist auch die *Entfärbung der grünen Zellen in Glucoselösung nach 24 Std sichtbar verzögert.* Dagegen ist eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von AO und NaN_3 nicht zu bemerken.

Die durch Azid bewirkte *Verzögerung* der Rotfärbung ist streng zu unterscheiden von der *Verhinderung* der Rotfluorochromierbarkeit durch Glucose. Nach 24 Std werden bei Azidzusatz die gleichen Prozentsätze roter Zellen wie bei den Kontrollen in Leitungswasser (100% bei S.D. 1:200) und in Glucoselösung (40%) gefunden.

f) Der Einfluß von vollständiger Nährlösung auf die Anfärbung. Es erschien zweckmäßig, fernerhin die Anfärbung in Gegenwart einer vollständigen Nährlösung zu untersuchen, die unter normalen Bedingungen

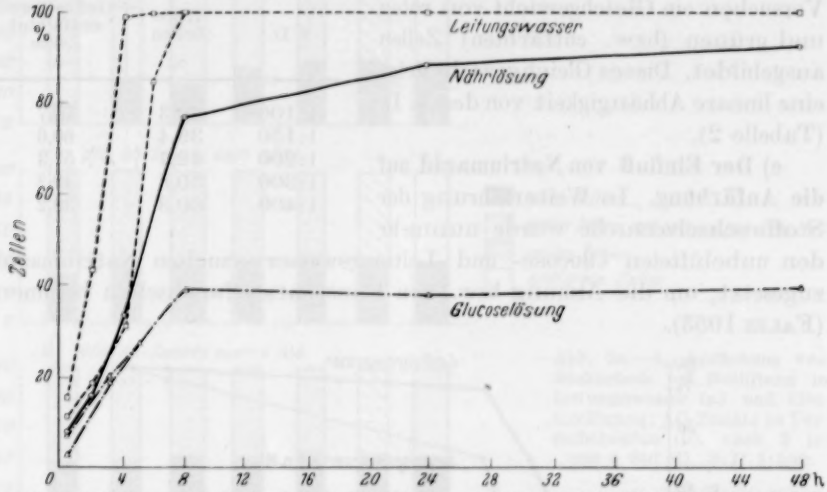


Abb. 9. Anfärbung von Bäckerhefe in Nährlösung nach Schopfer. Zum Vergleich sind die Anfärbekurven in Leitungswasser und Glucoselösung mit eingezeichnet. S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen bzw. grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

ein gutes Wachstum der Hefe und damit auch einen intensiven *N-Umsatz* ermöglicht.

1 g Hefe wurde in 200 ml Nährlösung nach Schopfer suspendiert und mit AO 1:10000 angefärbt.

Zum Vergleich sind in Abb. 9 die Anfärbekurven in Leitungswasser und Glucoselösung bei gleicher S.D. eingezeichnet.

Der Prozentsatz roter Zellen ist in Nährlösung von Anfang an wesentlich höher als bei Anfärbung in Glucoselösung. Es werden keine grünen Zellen mit gelbroten Einschlüssen bemerkt. (Bei 2 Versuchen traten solche nach 2 Std auf, waren aber nach 4 Std wieder verschwunden. Dieses Verhalten konnte indessen nicht immer reproduziert werden und ist möglicherweise auf eine Lichtschädigung zurückzuführen.)

Wenn hier und im folgenden vom Fehlen der Einschlüsse gesprochen wird, so soll das nicht besagen, daß der Zellinhalt homogen rot oder grün fluoresciert. Vorhandene Einschlüsse heben sich lediglich weniger deutlich aus dem Zellinhalt heraus und entziehen sich somit bei einer schnellen Durchmusterung der Beobachtung.

Ferner muß berücksichtigt werden, daß es unter den hier geschilderten Bedingungen nicht möglich ist, beim Fehlen einer grünen Plasmafluorescenz Einschlüsse eindeutig zu identifizieren, da sie eine sehr verschiedene Größe haben können. Solche Zellen sind daher meist unter den roten Zellen aufgeführt worden.

Die *Intensität* der Anfärbung der roten und auch der grünen Zellen ist aber von der in Leitungswasser beobachteten verschieden. Bei den grünen Zellen ist sie zu Anfang schwächer als in Leitungswasser oder Glucoselösung. Später vertieft sich die Färbung, anschließend folgt eine *Entfärbung*, so daß nach 24 bzw. 48 Std keine grünen Zellen mehr auf-

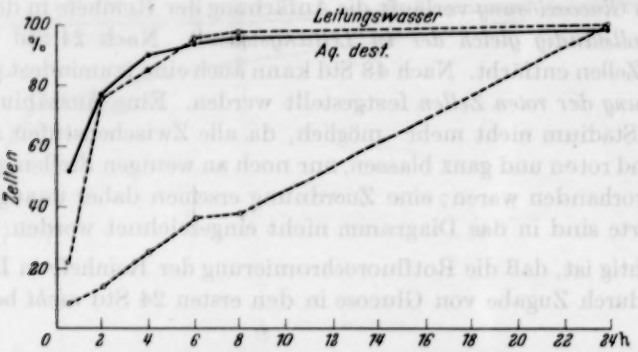


Abb. 10. Anfärbung von Reinhefe in Aq. dest. und Leitungswasser S.D. 1:200. Ordinate: Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen bzw. grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

gefunden werden können. Eine Messung der Färbungsintensität der einzelnen Zellen ist im Fluorescenzmikroskop nicht möglich; daher können die hier erhaltenen Ergebnisse nicht mehr mit den bei den vorher durchgeführten Versuchen gewonnenen Resultaten verglichen werden.

g) Die Anfärbung von Reinhefen. Da Bäckerhefe meist aus einer mehr oder weniger großen Zahl verschiedener Heferassen besteht und diese untereinander möglicherweise ein verschiedenes Anfärbeverhalten zeigen können, sollten zunächst an einer Einzellkultur die wichtigsten, mit Bäckerhefe gemachten Versuche wiederholt werden.

Es wurde in der S.D. 1:200 gearbeitet und folgende Versuchszusammenstellungen mit den entsprechenden der Bäckerhefe verglichen:

1. Reinhefe in Leitungswasser.
2. Reinhefe in Aq. dest.
3. Reinhefe in Glucoselösung.
4. Reinhefe in Schopfer-Lösung.

Die Ergebnisse veranschaulicht Abb. 10.

a) In Leitungswasser ist das Verhalten der Reinhefe ähnlich dem der Bäckerhefe (vgl. Abb. 1). Die Zahl der roten Zellen ist nach 30 min höher als bei Bäckerhefe, später geringer, und nach 24 Std ist auch hier alles rot gefärbt. Der Prozentsatz grüner Zellen verringert sich in der gleichen Weise. Die Qualität der Grünfärbung entspricht nicht der der

Bäckerhefe. Sie ist hier viel blasser und uneinheitlich, da sie von Grün nach Gelb wechselt; dunkel- und leuchtend grüne Zellen sieht man nur selten. Eine Differenzierung in verschiedene Farbqualitäten war nicht durchführbar.

b) In *Aq. dest.* (vgl. dazu Abb. 3) ist die Zahl der rotfluorescierenden Zellen wesentlich höher als bei Bäckerhefe und erreicht schon nach 8 Std 100%. Es treten keinerlei oder nur ganz schwach gefärbte grüne Zellen auf.

c) In *Glucoselösung* verläuft die Anfärbung der Reinhefe in den ersten 8 Std *vollständig gleich der in Leitungswasser.* Nach 24 Std sind die grünen Zellen entfärbt. Nach 48 Std kann auch eine (zumindest partielle) *Entfärbung der roten Zellen* festgestellt werden. Eine Auszählung ist in diesem Stadium nicht mehr möglich, da alle Zwischenstufen zwischen leuchtend roten und ganz blassen, nur noch an wenigen Stellen gefärbten Zellen vorhanden waren; eine Zuordnung erschien daher unangebracht. Die Werte sind in das Diagramm nicht eingezeichnet worden.

Wichtig ist, daß die Rotfluorochromierung der Reinhefe in Leitungswasser durch Zugabe von Glucose in den ersten 24 Std *nicht* beeinflußt wird.

d) In *Nährlösung* gefärbt, waren Reinhefezellen unter dem Fluorescenzmikroskop überhaupt nicht mehr auszuzählen. Grüne Zellen traten nicht auf, und die Fluorescenz der roten war so schwach, daß keine reproduzierbaren Werte erhalten wurden. Nach 24 Std nahm die Intensität der Rotfärbung etwas zu, aber die Zellen waren wie unter c) so unterschiedlich gefärbt, daß eine Auszählung keinen Erfolg versprach.

Ohne eine eingehende Besprechung der hier vorgelegten Färbebefunde vorwegnehmen zu wollen, lassen sich bereits folgende Feststellungen treffen: 1. Verschiedene Hefen zeigen unter gleichen äußeren Bedingungen nicht das gleiche Anfärbebild. 2. Bei einunderselben Hefe und gleicher Suspensionsdichte wird das Färbebild unterschiedlich verändert, je nach der Art und der Intensität der Stoffwechselvorgänge, ohne daß indessen eine direkte Proportionalität aufgezeigt werden könnte. Der kausale Zusammenhang zwischen der Anfärbung und der (stoffwechsel-) physiologischen Aktivität der Zelle ist wesentlich verwickelter, als daß man den physiologischen Zustand an Hand des Färbebildes charakterisieren bzw. umgekehrt aus der gesetzten Veränderung des physiologischen Zustandes die darauffolgende Veränderung des Färbebildes voraussagen könnte. Es schien daher angezeigt zu prüfen, ob etwa die physikalisch zu messende Farbstoff*aufnahme* besser zum Stoffwechsel in Beziehung gesetzt werden kann als der mikroskopische Färbebefund.

2. *Die Bestimmung der Farbstoffaufnahme.*

Analog der von KÖLBEL (1947) angewendeten Methode wurde die in der Suspensionflüssigkeit zurückbleibende Farbstoffmenge photometrisch bestimmt. Die Suspensionen wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten, wie bei der Fluorescenzkontrolle. Nach 30 min, $1^1/_2$, $2^1/_2$, 5, 8, 24 und 48 Std wurden Proben entnommen, die Hefe ab-

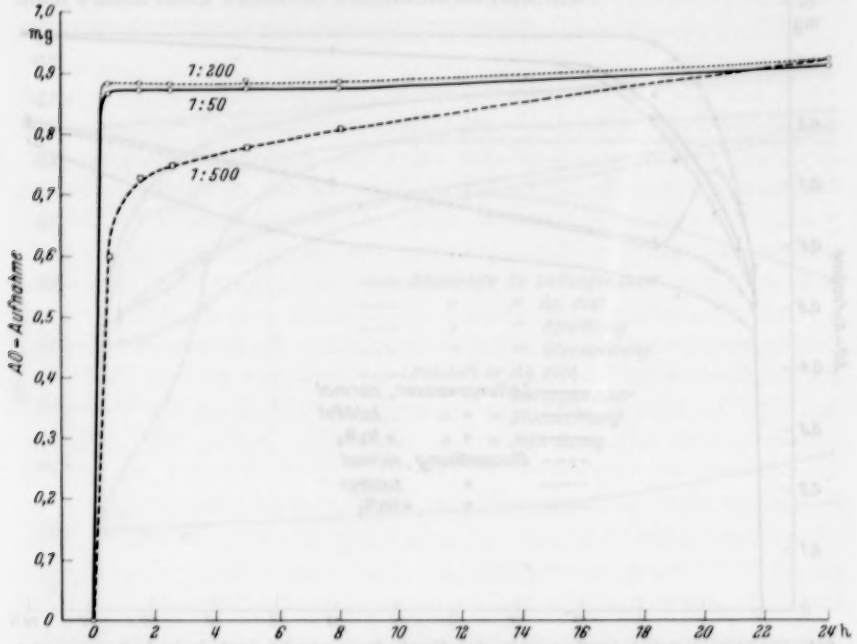


Abb. 11. Photometrisch bestimmte Farbstoffaufnahme von Bäckerhefe in Aq. dest., S.D. 1:50, 1:200, und 1:500. Ordinate: aufgenommenes AO in mg; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

zentrifugiert und die überstehende Lösung mit dem PULFRICH-Photometer gemessen. Die Farbstoffkonzentration ließ sich dann aus den Extinktionswerten mit Hilfe einer Eichkurve berechnen. Die Differenz zu der zu Versuchsbeginn in der Suspensionsflüssigkeit befindlichen Farbstoffmenge ergibt die von allen Hefezellen insgesamt aufgenommene Menge Farbstoff.

a) Die Farbstoffaufnahme bei verschiedener Suspensionsdichte. Zuerst wurde die Farbstoffaufnahme von Bäckerhefe bei Anfärbung in Aq. dest. in den S.D. 1:50, 1:200 und 1:500 gemessen (Abb. 11).

Die Kurven verlaufen bei 1:50 und 1:200 praktisch gleich. Bereits nach $^1/_2$ Std befindet sich mehr als 90% der innerhalb von 24 Std aufgenommenen Farbstoffmenge in den Zellen. Bei 1:500 ist die Aufnahme

zu Versuchsbeginn verzögert, erreicht aber nach 24 Std den gleichen Wert wie bei 1:50 und 1:200.

Bei einunddemselben Suspensionsmittel — in diesem Falle Aq. dest. — wird von Bäckerhefe im „kritischen Bereich" der Suspensionsdichte (s. S. 330) innerhalb von 24 Std in allen Suspensionsdichten die *gleiche* Farbstoffmenge aufgenommen.

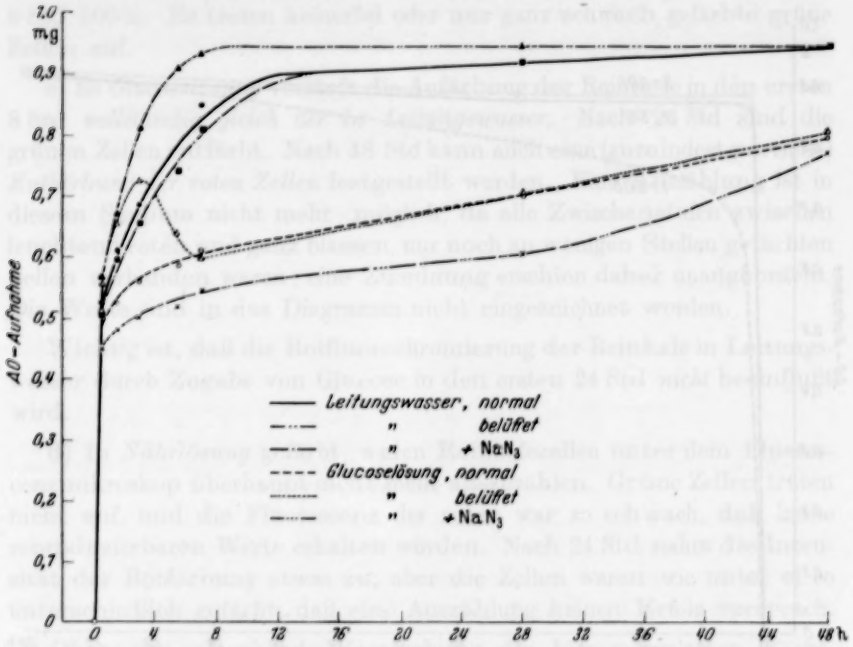


Abb. 12. Photometrisch bestimmte Farbstoffaufnahme von Bäckerhefe in Leitungswasser und Glucoselösung bei Belüftung und Azidzusatz. S.D. 1:200. Ordinate: aufgenommenes AO in mg; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

b) Die Farbstoffaufnahme bei Belüftung und Azidzusatz. Bäckerhefe wurde 1:200 in reinem Leitungswasser und in Glucoselösung suspendiert und mit AO versetzt. Die Kontrollen blieben unbeeinflußt, jeweils ein Ansatz wurde belüftet, ein weiterer mit Natriumazid (10^{-3} mol) versetzt (Abb. 12).

Bei den *Kontrollen* ist die Farbstoffaufnahme in *Glucose*lösung im Vergleich zu derjenigen in Leitungswasser *verzögert*.

Belüftung *beschleunigt* die Farbstoffaufnahme in Leitungswasser und Glucoselösung. In letztere wird nach 3 Std wieder Farbstoff *abgegeben*, bis nach 7 Std der entsprechende Wert der Kontrolle erreicht wird. Während der weiteren Versuchsdauer verlaufen beide Kurven gleich.

Azid *verzögert* die Farbstoffaufnahme. Die Verzögerung ist in Leitungswasser weniger ausgeprägt als in Glucoselösung als Suspensionsmittel.

c) Die Farbstoffaufnahme bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit (unbelüftete Kulturen). Bäckerhefe und Reinhefe wurden 1:200 suspendiert in

a) Leitungswasser,
b) Aq. dest.,
c) 1%iger Glucoselösung,
d) Schopfer-Lösung.

Beim Vergleich der Kurven in Abb. 13 sieht man, daß Bäckerhefe in allen Fällen mehr Farbstoff aufnimmt als Reinhefe.

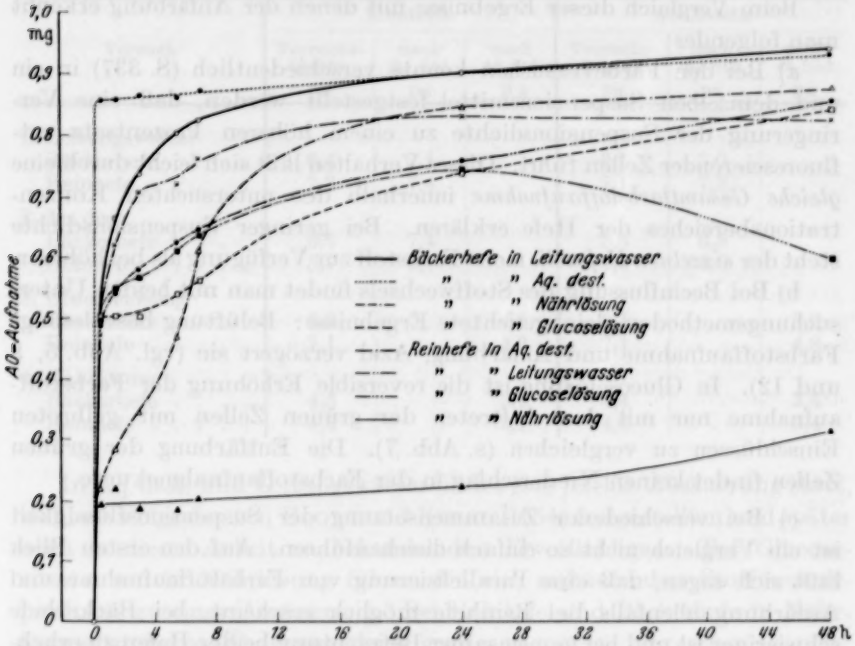


Abb. 13. Photometrisch bestimmte Farbstoffaufnahme von Bäckerhefe und Reinhefe in verschiedenen Suspensionsflüssigkeiten. S. D. 1:200. Ordinate: aufgenommenes AO in mg; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

In *Aq. dest.* verläuft die Farbstoffaufnahme bei beiden Hefen am schnellsten. Bäckerhefe hat nach 30 min den weitaus größten Teil des Farbstoffes aufgenommen (85%), und bis zum Versuchsende werden nur noch weitere 9% der Suspensionsflüssigkeit entzogen. Bei Reinhefe ist die Farbstoffaufnahme nach ungefähr 12 Std mit 83% beendet.

In *Leitungswasser* wird der Farbstoff von beiden Hefen *langsamer* aufgenommen: Bei Bäckerhefe erreicht die Aufnahme erst nach 24 Std, bei Reinhefe sogar erst nach 40 Std den gleichen Wert wie in destilliertem Wasser.

In *Glucoselösung* nimmt Bäckerhefe den Farbstoff noch langsamer auf und hat nach 48 Std erst 84% gespeichert. Die entsprechende Kurve der Reinhefe verläuft während der ersten 24 Std gleich der in Leitungs-

wasser aufgenommenen. Dann wird der Farbstoff wieder abgegeben: *die Farbstoffmenge in der Suspensionsflüssigkeit steigt* von 25% nach 24 Std wieder auf 40% nach 48 Std an.

In *Nährlösung* unterscheiden sich beide Hefen am stärksten: Bäckerhefe speichert hier *mehr* Farbstoff als in Glucoselösung, Reinhefe nimmt hingegen in der ersten $^1/_2$ Std *nur 20%* des Farbstoffes und während der folgenden Versuchszeit *nur noch weitere 10%* auf.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der Anfärbung erkennt man folgendes:

a) Bei den Färbeversuchen konnte verschiedentlich (S. 337) in ein und demselben Suspensionsmittel festgestellt werden, daß eine Verringerung der Suspensionsdichte zu einem höheren Prozentsatz rotfluorescierender Zellen führt. Dieses Verhalten läßt sich leicht durch eine *gleiche Gesamtfarbstoffaufnahme* innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches der Hefe erklären. Bei geringer Suspensionsdichte steht der *einzelnen Hefezelle* mehr Farbstoff zur Verfügung als bei höherer.

b) Bei Beeinflussung des Stoffwechsels findet man mit beiden Untersuchungsmethoden gleichgerichtete Ergebnisse: Belüftung beschleunigt Farbstoffaufnahme und Anfärbung, Azid verzögert sie (vgl. Abb. 5, 8 und 12). In Glucoselösung ist die reversible Erhöhung der Farbstoffaufnahme nur mit dem Auftreten der grünen Zellen mit gelbroten Einschlüssen zu vergleichen (s. Abb. 7). Die Entfärbung der grünen Zellen findet keinen Niederschlag in der Farbstoffaufnahmekurve.

c) Bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit ist ein Vergleich nicht so einfach durchzuführen. Auf den ersten Blick läßt sich sagen, daß eine Parallelisierung von Farbstoffaufnahme und Anfärbung allenfalls bei Reinhefe möglich erscheint, bei Bäckerhefe schwieriger ist und bei gemeinsamer Betrachtung beider Hefen zu erheblichen Unstimmigkeiten führt.

Eine eingehende Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit denen der Anfärbung soll erst im III. Teil zusammen mit den noch folgenden über die Wirkungen des Farbstoffes auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Zellen unternommen werden.

3. Die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration.

Die Arbeiten von Strugger (1940) und Kölbel (1947) ließen die Wichtigkeit der Einhaltung einer bestimmten Wasserstoffionenkonzentration des Farbbades erkennen. Von diesen Autoren wird empfohlen, zur Erzielung gleichmäßiger Färbeergebnisse und zur Ausschaltung schädlicher Wirkungen in neutraler, gepufferter Außenlösung zu arbeiten.

Es war daher wünschenswert, die im Verlaufe der 24- bzw. 48-Std-Versuche in der Außenlösung auftretenden p_H-Änderungen zu verfolgen.

Aus einer großen Anzahl von Versuchsergebnissen seien hier diejenigen angeführt, die sich auf die gleichen Versuchsanordnungen wie bei der photometrischen Farbstoffbestimmung (bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit) beziehen. Als Kontrollen dienten gleiche Ansätze ohne AO (Tabelle 3).

Tabelle 3. *Änderungen der* p_H*-Werte.* S.D. 1:200.

Versuch	Kontrolle			AO-Zusatz		
	Versuchsbeginn p_H	nach 24 Std p_H	nach 48 Std p_H	Versuchsbeginn p_H	nach 24 Std p_H	nach 48 Std p_H
1. Leitungswasser						
Bäckerhefe	6,4	7,1		6,1	7,0	
Reinhefe	7,3	7,4		7,1	7,2	
2. Aq. dest.						
Bäckerhefe	6,7	7,4		5,5	6,5	
Reinhefe	5,7	6,7		4,8	6,0	
3. Glucoselösung						
Bäckerhefe	6,2		4,5	6,4		3,9
Reinhefe	7,1		4,2	7,1		4,8
4. Nährlösung						
Bäckerhefe	4,5		3,1	4,4		3,4
Reinhefe	4,6		3,1	4,5		3,4

In Aq. dest. und Leitungswasser findet eine leichte Absäuerung statt, wohl als Folge des von Bogen und Keser (1954) festgestellten und später noch in dieser Arbeit zu behandelnden Eiweißabbaues. Bei Glucosezusatz und in Nährlösung führen die sich anhäufenden Stoffwechselprodukte zu einer Ansäuerung. Bei Reinhefe und Bäckerhefe in Nährlösung ist die p_H-Änderung gleich groß.

Zumindest bei Leitungswasser liegt der p_H-Wert der Außenlösung während des ganzen Versuches in der Nähe des Neutralpunktes, so daß durchgehend „optimale" Färbebedingungen gegeben sind. Gerade hier aber bestehen (bei Bäckerhefe) extreme Unterschiede sowohl in der Anfärbung als auch in der Farbstoffaufnahme zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende. Es ist völlig ausgeschlossen, diese Differenzen auf p_H-Unterschiede in der Außenlösung zurückzuführen.

In allen anderen Fällen erhöhen sich Farbstoffaufnahme und Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen im Verlaufe des Versuches ebenfalls; gleichwohl verschiebt sich der p_H-Wert der Außenlösung in Aq. dest. vom saueren zum neutralen, in Glucoselösung vom neutralen zum saueren und in Nährlösung vom saueren zum noch stärker saueren Bereich. (Ausgenommen ist lediglich Reinhefe in Glucoselösung: Hier nehmen nach anfänglicher Steigerung Farbstoffaufnahme und Rotfluorescenz

gegen Versuchsende wieder ab.) Auch hier sind die p_H-Änderungen in der Außenlösung nicht maßgebend für Farbstoffaufnahme und Anfärbung.

Demzufolge war es auch nicht möglich, rotfluorochromierte Hefezellen (Bäckerhefe in Leitungswasser, S.D. 1:200, nach 24stündiger Anfärbung) durch Übertragung in ein auf p_H 3,5 *gepuffertes Farbbad* (Phosphatpuffer) zu entfärben. Die gleiche Hefe wurde jedoch nach Übertragung in *Glucoselösung* innerhalb von 8 Std soweit entfärbt, daß das gleiche Zahlenverhältnis auftrat, wie in solcher Bäckerhefe, die von vornherein in Glucoselösung fluorochromiert wurde (40—45% rot, 55—60% grün bzw. farblos). Daraus wird besonders deutlich, daß der *Stoffwechsel* und damit auch der p_H-Wert im Zell*inneren* die Farbstoffaufnahme bestimmt (vgl. S. 368).

4. Die Beeinflussung des Wachstums.

Nachdem Bogen (1953) eine Hemmung des Wachstums von Hefezellen durch AO-Einwirkung beobachtet hatte, war es erforderlich, diesen Einfluß genauer zu untersuchen, insbesondere bei verschiedenen Suspensionsdichten und Ernährungsbedingungen, und zwar sowohl an Bäckerhefe als auch an Reinhefe.

Die Suspensionen wurden wie bei den vorhergehenden Versuchen hergestellt und behandelt. Zu Versuchsbeginn, nach 4, 8, 24 und 48 Std wurden Proben entnommen und mit Hilfe der Zählkammer nach Thoma unter dem Mikroskop die Suspensionsdichte festgestellt. Nach 24 bzw. 48 Std wurde von der Suspensionsflüssigkeit abzentrifugiert und die Hefezellen aus allen Versuchsreihen erneut in einer, der ursprünglichen Flüssigkeitsmenge entsprechenden, Menge *Nährlösung* nach Schopfer ohne AO-Zusatz suspendiert. In diesen neuen Suspensionen wurde dann die Zellzahl sofort, nach 8, 24 und 48 Std in der angegebenen Weise ermittelt. Kontrollen blieben ohne AO.

a) Das Wachstum in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit. Es wurden die gleichen 4 Kombinationen, wie in den vorangehenden Versuchen, angesetzt:

1. Bäckerhefe und Reinhefe in Leitungswasser.
2. Bäckerhefe und Reinhefe in Aq. dest.
3. Bäckerhefe und Reinhefe in Glucoselösung.
4. Bäckerhefe und Reinhefe in Nährlösung.

Bei 1. und 2. wurde nach 24, bei 3. und 4. nach 48 Std abzentrifugiert. Darstellung der Ergebnisse in Abb. 14.

α) Wachstum bis zum Abzentrifugieren. Wegen Nährstoffmangels findet weder in Leitungswasser noch in Aq. dest. ein Wachstum statt. In reiner Glucoselösung nimmt die Zellzahl in 48 Std um 45% (Bäckerhefe) bzw. 20% (Reinhefe) zu; bei AO-Zusatz wächst die Bäckerhefe noch um 28%, die Reinhefe nicht mehr. In Schopfer-Lösung ist das Wachstum erheblich stärker: In der AO-freien Nährlösung nimmt die Zellzahl um 238% (Bäckerhefe) bzw. 74% (Reinhefe) zu; bei AO-Zusatz

wächst Bäckerhefe hier gleichfalls noch um 20%, dagegen ist das Wachstum der Reinhefe *während der ersten 24 Std vollständig gehemmt*; *dann erfolgt ein steiler Anstieg um 115%*, womit der Kontrollwert noch überschritten wird. Gleichzeitig ist das Auftreten größerer Hefemengen auf der Oberfläche der Nährlösung bemerkbar.

β) Wachstum nach Übertragung in frische, AO-freie Nährlösung. Die unbehandelten Kontrollen der Bäckerhefe wachsen in allen Kombi-

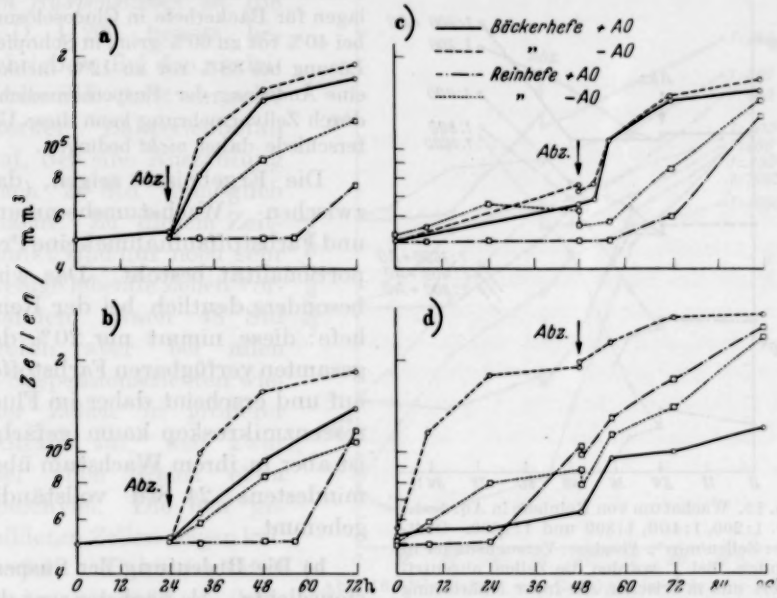


Abb. 14. Das Wachstum von Bäckerhefe und Reinhefe in Leitungswasser (*a*). Aq. dest. (*b*), Glucoselösung (*c*) und Nährlösung (*d*). S.D. 1:200. Ordinate: Zellen/mm³; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Bei ↓ wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischer, AO-freier Nährlösung suspendiert.

nationen besser als die der Reinhefe. Bei der Besprechung der Einzelheiten ist es zweckmäßig, Bäckerhefe und Reinhefe zu trennen.

AO-behandelte *Bäckerhefe* zeigt, wenn sie aus Leitungswasser- oder Glucoseversuchen stammt, einen Wachstumsanstieg, der nur wenig unter dem der Kontrolle liegt, während das Wachstum der aus destilliertem Wasser und besonders der aus Nährlösung übertragenen Hefen bedeutend stärker gehemmt ist.

Bei *Reinhefe* bleibt nach vorheriger AO-Behandlung in Aq. dest. und Leitungswasser das Wachstum über *mindestens weitere 32 Std sistiert*; erst dann setzt ein lebhafter Anstieg ein. Bei der Hefe des Glucoseversuches ist ein langsamer Anstieg schon nach 24 Std bemerkbar; die in Schopfer-Lösung vorbehandelte Hefe liefert schließlich ein so starkes Wachstum, daß die Kurve immer über der der Kontrolle bleibt.

Beim Wachstum der Reinkulturen sind hier, wie auch bei allen späteren Versuchen, stets Oberflächenhefen auf der Nährlösung zu beobachten.

In Aq. dest. und in Leitungswasser tritt keine Änderung in der Suspensionsdichte ein, die eine Abweichung in der Anfärbung hervorrufen könnte. In Glucose- und Schopfer-Lösung findet bei Bäckerhefe ein Wachstum um ungefähr 20% statt, also eine Erhöhung der S.D. von 5,2 auf $6{,}3 \cdot 10^4$ Zellen/mm³. Bei dieser S.D. ergaben die Ermittlungen von Bogen (1953) bei Anfärbung in destilliertem Wasser nach 24 Std für Bäckerhefe ein Verhältnis von 65% Rotfluorescenz zu 35% Grünfluorescenz. Die hier gemessenen Werte lagen für Bäckerhefe in Glucoselösung bei 40% rot zu 60% grün, in Schopfer-Lösung bei 88% rot zu 12% farblos; eine Änderung der Suspensionsdichte durch Zellvermehrung kann diese Unterschiede daher *nicht* bedingen.

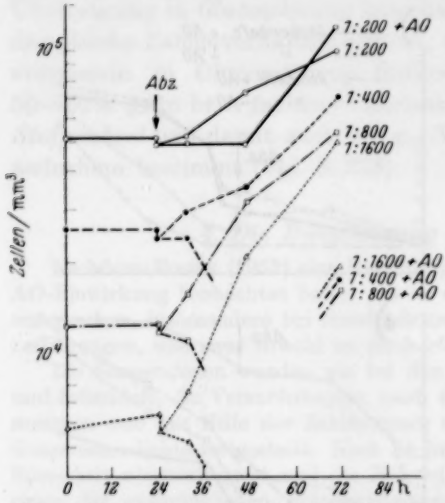


Abb. 15. Wachstum von Reinhefe in Aq. dest., S.D. 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600. Ordinate: Zellen/mm³; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Bei ↓ wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischer, AO-freier Nährlösung suspendiert.

Die Ergebnisse zeigen, daß zwischen Wachstumshemmung und Farbstoffaufnahme keine Proportionalität besteht. Das wird besonders deutlich bei der Reinhefe: diese nimmt nur 20% des gesamten verfügbaren Farbstoffes auf und erscheint daher im Fluorescenzmikroskop kaum gefärbt, ist aber in ihrem Wachstum über mindestens 24 Std vollständig gehemmt.

b) Die Bedeutung der Suspensionsdichte. Als nächstes war die Nachprüfung wichtig, ob man bei Erniedrigung der Suspensionsdichte, d. h. Erhöhung der Farbstoffmenge je Zelle, zu einem Bereich kommt, in dem der Farbstoff zu einer vollständigen und dauernden Unterbindung des Wachstums führen kann, die auch nach Übertragung in frische, AO-freie Nährlösung anhält. Da hier mit Resistenzunterschieden der verschiedenen Heferassen zu rechnen ist, können diese Versuche nur mit Reinhefe durchgeführt werden. Von dieser wurden folgende Suspensionen in *destilliertem Wasser* hergestellt:

1. 1:200 ($= 5 \cdot 10^4$ Zellen/mm³).
2. 1:400 ($= 2{,}5 \cdot 10^4$ Zellen/mm³).
3. 1:800 ($= 1{,}25 \cdot 10^4$ Zellen/mm³).
4. 1:1600 ($= 0{,}63 \cdot 10^4$ Zellen/mm³).

Die Ansätze wurden wie unter 4a behandelt. Das Ergebnis ist aus Abb. 15 abzulesen. In Aq. dest. findet, wie zu erwarten war, in keinem Falle ein Wachstum statt.

Nach Übertragung in AO-freie Nährlösung wachsen die ungefärbten Suspensionen umso stärker, je niedriger die Dichte in der Ausgangssuspension war:

nach 48 Std bei 1:200 um 93%, 1:800 um 355%,
1:400 um 174%, 1:1600 um 853%.

Es besteht eine umgekehrte, nahezu lineare Proportionalität.

Bei den *AO-behandelten Suspensionen* ist die S.D. 1:200 bereits beschrieben. Bei den niedrigeren S.D. tritt ein sehr starker Bakterienbefall auf, der eine Auszählung nach 24 Std unmöglich macht. Zu diesem Zeitpunkt sind nur noch sehr wenige lebende Zellen vorhanden. Nach 48 Std treten aber bei allen 3 Suspensionsdichten wieder Zellen in größerer Anzahl auf, und zwar bei allen dreien etwa gleichviel. Die neu gebildeten Zellen zeigen keinerlei Bakterienbefall mehr und sind in ihrer Gestalt nicht wesentlich von normalen Hefezellen verschieden.

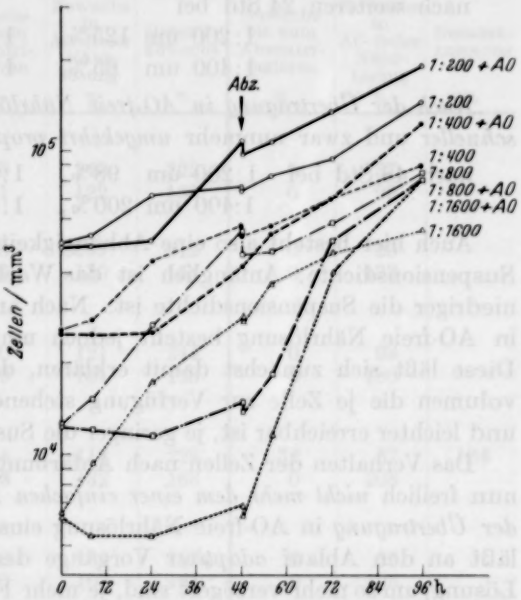


Abb. 16. Wachstum von Reinhefe in Schopfer-Lösung S.D. 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600. Ordinate: Zellen je mm³; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Bei ↓ wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischer, AO-freier Nährlösung suspendiert.

Dieses spricht dafür, daß bei geringer Suspensionsdichte fast alle Zellen abgetötet werden. Die Ausscheidung von Bakterienhemmstoffen hört auf, und die abgetöteten Zellen werden von den Bakterien aufgezehrt. Nur wenige Zellen überleben und gelangen zu neuem Wachstum. Die Wirkung des AO könnte demnach in einer *Selektion* bestehen. Hierzu sollen später weitere Anhaltspunkte treten (s. S. 354). Es steht jedenfalls fest, daß nach Unterschreitung der S.D. 1:400 die Farbstoffmenge ausreicht, um die Zellen der Population in Aq.dest. abzutöten. Das Überleben der selektierten Zellen ist dann unabhängig von der Farbstoffkonzentration.

Der gleiche Versuch wurde mit Nährlösung nach SCHOPFER an Stelle von Aq.dest. wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

Bis zum Abzentrifugieren wachsen auch hier die Kontrollen um so stärker, je niedriger die Dichte der Ausgangssuspension war:

nach 48 Std bei 1:200 um 53%, 1:800 um 310%,
1:400 um 124%, 1:1600 um 335%.

Mit AO-behandelte Hefen wachsen 24 Std lang *nicht*, dann erfolgt ein Anstieg *proportional* der S.D.:

nach weiteren 24 Std bei
1:200 um 125%, 1:800 um 32%,
1:400 um 65%, 1:1600 um 25%.

Nach der Übertragung in AO-freie Nährlösung wachsen diese Hefen *schneller* und zwar nunmehr *umgekehrt proportional* der S.D.:

nach 48 Std bei 1:200 um 98%, 1:800 um 485%,
1:400 um 200%, 1:1600 um 1350%.

Auch hier besteht also eine Abhängigkeit der AO-Wirkung von der Suspensionsdichte: Anfänglich ist das Wachstum um so geringer, je niedriger die Suspensionsdichte ist. Nach anschließender Übertragung in AO-freie Nährlösung besteht jedoch umgekehrte Proportionalität. Diese läßt sich zunächst damit erklären, daß bei gleichem Lösungsvolumen die je Zelle zur Verfügung stehende Nährstoffmenge größer und leichter erreichbar ist, je geringer die Suspensionsdichte ist.

Das Verhalten der Zellen nach Anfärbung in Nährlösung entspricht nun freilich *nicht mehr dem einer einfachen Selektion.* Das *sofort nach der Übertragung* in AO-freie Nährlösung einsetzende starke Wachstum läßt an den Ablauf *adaptiver* Vorgänge denken, wobei diese (in AO-Lösung) um so mehr verzögert sind, je mehr Farbstoff der Zelle zur Verfügung steht. Auch diese Frage wird weiter unten nochmals experimentell behandelt (s. S. 353).

c) Der Einfluß der einzelnen Bestandteile der Nährlösung. Da die Wirkung des AO auf den Proteinumbau bekannt ist (Bogen und Keser 1954), war es von Interesse festzustellen, ob das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Bestandteile der Nährlösung einen Einfluß auf die Wachstumswirkung des AO hat.

Es wurde mit Bäckerhefe und Reinhefe in der Anfangskonzentration von 1:200 gearbeitet. In der als Suspensionsmittel dienenden Aq. dest. waren wechselweise die einzelnen Bestandteile der Nährlösung nach Schopfer einzeln oder im Gemisch gelöst. Die Versuchszusammenstellungen und -ergebnisse sind aus Tabelle 4 zu entnehmen.

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß bei den Kontrollen in allen Kombinationen der Zuwachs immer geringer ist als in vollständiger Nährlösung.

Ferner wächst in den Kontrollen die Bäckerhefe schneller als die Reinhefe, während AO-behandelte Suspensionen das umgekehrte Ver-

Tabelle 4. *Wachstum bei Zusatz der einzelnen Bestandteile der Nährlösung nach* SCHOPFER *zu Aq. dest. als Suspensionsmittel.*
Zuwachs in Prozenten der Ausgangswerte. Nach Übertragung in AO-freie, vollständige Nährlösung diente die bei der Übertragung ermittelte S.D. als Ausgangswert. Der Gesamtzuwachs bezieht sich auf die S.D. (1:200) zu Beginn des Versuches.

Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit	Kontrolle ohne AO			Versuch mit AO		
	Zuwachs bis zum Abzentrifugieren %	Zuwachs in AO-freier Nährlösung %	Gesamtzuwachs %	Zuwachs bis zum Abzentrifugieren %	Zuwachs in AO-freier Nährlösung %	Gesamtzuwachs %
Glucose (5%)						
Bäckerhefe	36	140	222	0	37	
Reinhefe	11	122	130	0	99	
Glucose + Asparagin						
Bäckerhefe	58	107	212	0	29	
Reinhefe	17	130	154	0	173	
Glucose + Asparagin + Phosphat						
Bäckerhefe	70	121	244	0	98	
Reinhefe	19	131	153	0	180	
Nährlösung ohne Asparagin						
Bäckerhefe	74	112	228	32	67	124
Reinhefe	23	132	168	0	208	
Nährlösung ohne Phosphat						
Bäckerhefe	58	104	183	0	59	
Reinhefe	37	108	161	0	195	
Nährlösung, vollständig						
Bäckerhefe	238	43	500	20	89	125
Reinhefe	74	207	475	115	169	515

halten zeigen. Auffallend ist, daß außer der vollständigen Nährlösung nur die Asparagin- und damit N-freie Nährlösung den angefärbten Zellen der Bäckerhefe ein Wachstum ermöglicht.

Daraus darf man den Schluß ziehen, daß die AO-Behandlung dann am meisten schädigt, wenn der normale Stoffwechsel besonders rege ist. Andererseits ist aber diesen Zellen auch die Möglichkeit gegeben, nach Entfernung des Farbstoffes normal oder vielleicht sogar schneller zu wachsen.

In den folgenden Versuchen wurde das Asparagin durch andere Stickstoffquellen ersetzt. Verwendet wurde diesmal nur Bäckerhefe, die noch nicht an den Asparagin-N adaptiert war, in Schopfer-Lösung S.D. 1:200, Stickstoff wurde jeweils im gleichen molaren Verhältnis zugesetzt als Asparagin (1‰), Ammoniumsulfat (0,9‰), Kalium-

nitrat (1,35‰) oder Harnstoff (0,4‰). Auf eine graphische Darstellung kann verzichtet werden. Das Wachstum der Kontrollen wird wie folgt gefördert:

Asparagin < Ammonsiumsulfat < Kaliumnitrat < Harnstoff.

Die mit AO versetzten Suspensionen ergeben bei der letzten Auszählung die *umgekehrte* Reihenfolge. Die Werte liegen zwar dicht zusammen, und die Wachstumskurven überschneiden sich hier und da; dennoch sprechen die hier und im oben angeführten Versuch erhaltenen Ergebnisse dafür, daß eine Veränderung im N-Haushalt der Zelle für die AO-Wirkung insofern von Bedeutung ist, als einer Erhöhung des N-Umsatzes eine stärkere Hemmung des Wachstums entspricht. Weitere Aufschlüsse müssen durch biochemische Bestimmungen des N-Umsatzes mit markiertem N gewonnen werden.

d) Versuche zur Erklärung des Wachstums in AO-haltiger Nährlösung. Es bleibt vorläufig noch die Frage zu beantworten, weshalb in AO-haltiger Nährlösung, besonders bei Reinkulturen, ein Wachstum auftritt, das unter Umständen stärker sein kann, als das der Kontrolle.

Die Beobachtungen hatten ergeben, daß bei der Anfärbung die feuerrot gefärbten Zellen mit „destruiertem" Plasma stark geschrumpft waren, und Bogen und Keser (1954) konnten zeigen, daß mit der Zellschädigung durch AO eine Erhöhung der Permeabilität und damit verbunden ein Austritt von Aminosäuren und vermutlich noch anderen Substanzen aus der Zelle einhergeht. Nun hatten Loofbourow und Mitarbeiter (1947), Webb und Loofbourow (1947), ferner Loofbourow (1947) beschrieben, daß bei der Schädigung von Hefezellen durch UV in der Suspensionsflüssigkeit Vitamine der B-Gruppe, Aminosäuren und Nucleinsäuren auftreten, die beim Zusatz zu einer geeigneten Nährlösung das Wachstum von Test-Hefestämmen stark beschleunigen können, was die Autoren als Wundhormonwirkung deuten. Es lag daher nahe anzunehmen, daß bei der Schädigung durch AO außer den Aminosäuren weitere wuchsfördernde Stoffe ausgeschieden werden, die in Nährlösung zu einem übernormalen Wachstum der ungeschädigten Zellen führen.

Das von Loofbourow angegebene Verfahren wurde folgendermaßen abgewandelt: Eine Störung der Permeabilität und damit verbundene Ausscheidung von Aminosäuren war besonders in Aq.dest. bekannt. Daher wurden Bäckerhefe und Reinhefe 1:200 in Aq.dest. verteilt, mit AO versetzt und 24 Std lang bei 25°C stehen gelassen. Kontrollen blieben ohne AO-Zusatz. Anschließend wurde abzentrifugiert und in den Suspensionsflüssigkeiten der noch verbliebene AO-Gehalt photometrisch bestimmt. Der Rückstand wurde mit einer kleinen Menge Wasser ausgewaschen und nach dem erneuten Abzentrifugieren die Waschflüssigkeiten den ursprünglichen Suspensionslösungen zugefügt. Dann wurden alle 4 Lösungen durch Zugabe der notwendigen Salze zur vollständigen Nährlösung ergänzt. 2 Kontrollnährlösungen wurden mit Aq.dest. angesetzt und nunmehr alle Flüssigkeiten auf den gleichen AO-Gehalt (1:160000) gebracht. Darauf wurde in den aus Bäckerhefe stammenden Suspensionsflüssigkeiten Bäckerhefe, in denen aus Reinhefe diese im Verhältnis 1:200 suspendiert und in den nächsten 48 Std das Wachstum gemessen.

Die Unterschiede der Wachstumskurven sind so gering, daß von einer Wachstumsförderung durch etwa ausgeschiedene Substanzen nicht gesprochen werden

kann. Damit ist zwar nicht ausgeschlossen, daß derartige Stoffe überhaupt vorhanden sind; sie können hier aber nicht zur Wirkung kommen, da andere, begrenzende Bedingungen vorliegen, wie vielleicht fehlende Belüftung oder andere.

Daher mußte das verstärkte Wachstum in Nährlösung anderen Faktoren zugeschrieben werden. Es lag nahe, an eine Adaptation der Hefe an AO zu denken, wie sie BASKETT (1951) beim Wachstum von *Bact. lactis aerogenes* in Gegenwart von Proflavin (2:8-Diaminoacridin) nachgewiesen hatte.

Zur Nachprüfung wurde Reinhefe 1:200 in Nährlösung suspendiert, mit AO versetzt, und das Wachstum der Zellen in der üblichen Weise

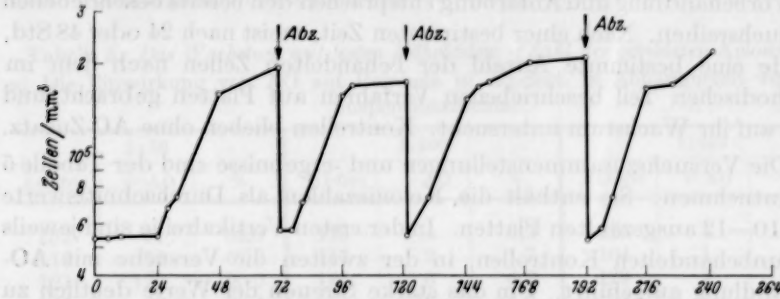


Abb. 17. Versuch über die Adaptation von Reinhefen an AO in Schopfer-Lösung. Ordinate: Zellen/mm³; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Bei ↓ wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischer AO-haltiger Nährlösung erneut auf die S. D. 1:200 eingestellt.

verfolgt. Nach 72 Std wurde abzentrifugiert und die Hefe in neuer, AO-haltiger Nährlösung derart suspendiert, daß die ursprüngliche S.D. von 1:200 erneut als Ausgang diente. Das gleiche Verfahren wurde im Anschluß noch zweimal wiederholt. Die Meßergebnisse sind in Abb. 17 eingetragen.

Das Wachstum ist am *Anfang* über einen Zeitraum von 24 Std *gehemmt* und steigt dann an. Dies steht in Übereinstimmung mit den früheren Versuchen (s. S. 347). Nach der Übertragung in neue Nährlösung ist, obwohl jetzt zu dem in den Zellen bereits vorhandenen Farbstoff neuer hinzukommt, die *Dauer der Wachstumshemmung* auf 4 Std *verringert* und nach jeder weiteren Übertragung tritt *von Anfang an ein starkes Wachstum* ein. Der Anstieg ist *jedesmal der gleiche.*

Der Ausfall dieses Versuches, der eine Modifizierung des DELBRÜCK-LURIA-Testes nach HINSHELWOOD (DEAN und HINSHELWOOD 1951, BASKETT 1951) darstellt, beweist das Vorliegen einer *Adaptation der Hefe an den Farbstoff.*

Aus Abb. 16 war abgeleitet worden, daß das Wachstum in AO-Gegenwart um so geringer ist, je kleiner die Suspensionsdichte ist. Es findet in *Nährlösung* aber noch bei Suspensionsdichten statt, bei denen in Aq.dest. die Zellen längst abgetötet worden sind (Abb. 15); sie müssen

daher im ersteren Fall an AO adaptiert sein. Nach Übertragung in neue Nährlösung, diesmal ohne AO, erweisen sich *alle* Zellen des Nährlösungsversuches als voll lebensfähig, während die Zellen des Aq.dest.-Versuches mit Ausnahme der wenigen selektierten nicht mehr leben.

c) Das Wachstum auf festen Nährböden. Versuch 2b (S. 349) hatte es wahrscheinlich gemacht, daß eine der Wirkungen des AO die der Selektion sei. Zu einer Nachprüfung sind Kulturen in flüssigem Nährmedium nicht geeignet. Hier muß an die Stelle der Beobachtung des Wachstums einer ganzen Kultur die der einzelnen Zelle treten. Eine Möglichkeit dazu eröffnen die sog. „Plattenversuche".

Vorbehandlung und Anfärbung entsprachen den bereits beschriebenen Versuchsreihen. Nach einer bestimmten Zeit, meist nach 24 oder 48 Std, wurde eine bestimmte Anzahl der behandelten Zellen nach dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren auf Platten gebracht und dort auf ihr Wachstum untersucht. Kontrollen blieben ohne AO-Zusatz.

Die Versuchszusammenstellungen und -ergebnisse sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Sie enthält die Koloniezahlen als Durchschnittswerte von 10—12 ausgezählten Platten. In der ersten Vertikalreihe sind jeweils die unbehandelten Kontrollen, in der zweiten die Versuche mit AO-Behandlung aufgeführt. Um das starke Streuen der Werte deutlich zu machen, wurde eine größere Anzahl von Versuchen aufgeführt.

Die Streuungen können zum Teil auf Versuchsfehlern beruhen, die durch das Verdünnen und Ausstreichen der Proben verursacht werden. Ferner weisen die Platten in Aq.dest., besonders bei der S.D. 1:800, starken Bakterienbefall auf (wie er ja auch bei den Versuchen in flüssigem Nährmedium festzustellen war). Indessen haben bereits Dean und Hinshelwood (1951) bei ihren Versuchen mit Proflavin an *Bact. lactis aerogenes* darauf hingewiesen, daß bei analogen Plattenversuchen auch bei strenger Einhaltung steriler Bedingungen große Streuungen auftraten, die von einer großen Zahl verschiedener Faktoren, wie z. B. Zellalter, p_H-Wert, Belüftung, Resistenz u. a. abhängig waren.

Daher läßt sich aus den Versuchen bei aller gebotenen Zurückhaltung folgendes entnehmen:

a) Bei der Anfärbung von Reinhefe in Aq.dest. nimmt die Koloniezahl mit der Suspensionsdichte ab. Aber auch bei 1:800 ist trotz starker Überfärbung noch rund 1% der Zellen lebensfähig (vgl. S. 349).

b) AO setzt die Überlebendenrate bei Reinkulturen (1:200) in Aq.dest. stärker herab als in Leitungswasser. Dies entspricht der höheren Farbstoffaufnahme, wie sie 24 Std nach AO-Zugabe in destilliertem und in Leitungswasser gemessen wurde (vgl. Abb. 13).

c) Bei Bäckerhefe beträgt der Prozentsatz der gebildeten Kolonien bei AO-Behandlung in Aq.dest 25—30%, in Glucoselösung 50 bis 60% (vgl. S. 334 und 333). In Leitungswasser ist die Koloniezahl unterschiedlich. Die Ergebnisse entstammen 2 Versuchsserien. Die erste (I) wurde im Winter 1953/54 aufgenommen und brachte rund 5% Kolonie-

bildung, die zweite (II) im Sommer 1954 mit 54,5%. Die Streuung innerhalb der beiden Reihen ist wesentlich geringer als die Abweichung der Mittelwerte beider Reihen voneinander. Dabei entspricht die Anzahl der bei II gebildeten Kolonien derjenigen in Glucoselösung (50—60%). Bei beiden Serien fand nicht der gleiche Agar Verwendung. Die im Winter ausgegossenen Platten wiesen eine wesentlich festere Konsistenz auf als die im Sommer hergestellten. Zur Erklärung der unterschiedlichen Überlebendenrate kann auf folgende Feststellungen hingewiesen werden:

1. Es ist möglich, in Leitungswasser zu 100% rot gefärbte Zellen nach Übertragung in AO-freie Glucoselösung zu 50—60% zu entfärben

Tabelle 5. *Das Wachstum auf festen Nährböden. (Zahl der gebildeten Kolonien.)*
a) Die Einwirkung von AO auf Reinhefe in Aq.dest. in Abhängigkeit von der Suspensionsdichte.

1:50			1:200			1:800		
AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%
152	91	59,8	139	4	2,9	126	1	0,8
118	79	67,0	117	2	1,7	104	1	1,0
121	122	100,0	144	6	4,2	129	1	0,8
141	88	62,4	171	10	5,9	93	1	1,1
201	127	63,2	170	29	17,0	168	3	1,8
733	507	*69,2*	741	51	*6,9*	620	7	*1,1*

b) Die Einwirkung von AO auf Reinhefe bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit S.D. 1:200.

Leitungswasser			Aq. dest.		
AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%
124	36	29,0	166	7	4,2
180	44	24,4	124	6	4,8
85	14	16,5	126	6	4,8
75	20	26,7	62	2	3,2
74	24	32,4	76	2	2,6
80	11	13,8	90	1	1,1
88	14	15,9	69	1	1,5
98	16	16,3	107	1	0,9
142	66	46,5	140	5	3,6
108	44	40,7	137	3	2,2
148	54	36,5	150	1	0,7
117	18	15,4	155	7	4,5
152	31	20,4	181	14	7,7
152	45	29,6	131	15	11,5
223	110	49,4	179	71	39,6
131	72	55,0	136	66	48,5
141	54	38,3	199	47	23,6
153	76	49,6	201	41	20,4
154	99	64,3	193	38	19,7
2425	848	*34,9*	2622	334	*12,7*

Tabelle 5. (Fortsetzung.)

c) Die Einwirkung von AO auf Bäckerhefe bei verschiedener Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit S.D. 1:200.

Leitungswasser			Aq. dest.			Glucoselösung		
AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%	AO-frei	+ AO	%
			I. Winter 1953/54.					
165	3	1,8	187	13	7,0	152	74	48,7
189	24	12,7	209	124	59,2	219	157	71,8
187	3	1,6	131	40	30,5	199	81	40,7
155	7	4,5	196	23	11,7	162	80	49,4
206	7	3,4	188	33	17,5	160	52	32,5
902	44	*4,9*	911	233	*25,6*	892	444	*49,8*
			II. Sommer 1954.					
224	120	53,6	215	105	48,8	139	119	85,5
230	126	54,8	205	22	10,7	188	119	63,2
222	105	47,3	213	29	13,6	179	110	61,5
192	105	54,8	212	89	42,0	128	74	57,8
202	127	62,9	212	63	29,7	157	90	57,2
228	126	55,3	217	52	24,0	142	71	50,0
			212	63	29,7			
			216	61	28,2			
1298	709	*54,5*	1702	484	*28,4*	933	583	*62,5*

(s. S. 346). Gleiches tritt nach Übertragung in Nährlösung ein, wenn auch hier dieser Prozentsatz wegen des bald eintretenden Wachstums nicht mehr reproduzierbar ist.

2. In Leitungswasser und Glucoselösung mit AO vorbehandelte Hefen zeigen nach Übertragung in AO-freie Nährlösungen *gleiches* Wachstum, das wenig unter dem der Kontrolle liegt (s. S. 347). Es ist somit möglich, einen Teil der rot fluorescierenden Zellen zu entfärben und andererseits ursprünglich rot gefärbte Zellen zum Wachstum zu bringen. Die Übereinstimmung der Anzahl der in der Versuchsserie II gebildeten Kolonien mit dem Prozentsatz entfärbter Zellen spricht dafür, daß eben diese *entfärbten Zellen wieder wachsen* können. In der Reihe I war der Agar wesentlich fester, so daß den Zellen nur wenig Feuchtigkeit zur Verfügung gestanden haben dürfte; daher gingen Glucoseaufnahme und Farbstoffabgabe langsamer vonstatten. Die Zellen konnten dann innerhalb der Versuchszeit nicht mehr wachsen.

d) Ferner wurde im Hellfeldmikroskop der Prozentsatz derjenigen Zellen bestimmt, die nach AO-Behandlung in Glucoselösung und in Leitungswasser eindeutig am destruierten Plasma und an der Zellschrumpfung als geschädigt zu erkennen waren. Eine größere Anzahl von Auszählungen brachte bei beiden Suspensionsmitteln 40—50% destruierter Zellen. Auch diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die *irreversible* Rotfärbung in Glucoselösung und in Leitungswasser mit einer

Tabelle 6. *Quantitative Bestimmungen des N-Stoffwechsels.* Bäckerhefe in Aq.dest., Leitungswasser und Glucoselösung, 1 Std und 24 Std mit AO angefärbt und ungefärbt. S.D. 1:200. N-Gehalt der 3 Fraktionen und Gesamt-N (a—d) sowie Trockengewicht der abzentrifugierten Hefe (e), Trockengewicht + Trockengewicht der Aminosäuren aus der Suspensionsflüssigkeit (mg N aus der Zeile d × 6,25; MENKE 1938, CHIBNALL 1939) (f) und Eiweißabbau in Prozenten der ungefärbten Kontrolle (g). Alle Werte in Milligramm bzw. Prozenten.

Eigenschaft der Suspension	1 Std gefärbt			24 Std gefärbt			Ungefärbt
	Gesamt-N	AO-N	Gesamt-N −AO-N	Gesamt-N	AO-N	Gesamt-N −AO-N	
A. Bäckerhefe in Aq.dest.:							
a) Gesamt-N, mg	3,595	0,189	3,406 = 100%	3,647	0,189	3,485 = 100%	3,028 = 100%
b) Eiweiß-N, mg	1,800	0,048	1,752 = 51,5%	1,895	0,078	1,817 = 52,0%	2,406 = 79,4%
c) Alkoholauszug, mg N	1,363	0,112	1,251 = 36,7%	1,118	0,095	1,023 = 29,5%	0,562 = 18,6%
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,432	0,029	0,403 = 11,8%	0,661	0,016	0,645 = 18,5%	0,060 = 2,0%
e) Trockengewicht, mg			51,1			49,5	52,0
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg			53,6			53,5	52,4
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %			35			35	
B. Bäckerhefe in Leitungswasser:							
a) Gesamt-N, mg	3,473	0,189	3,284 = 100%	3,357	0,189	3,168 = 100%	3,455 = 100%
b) Eiweiß-N, mg	2,148	0,008	2,140 = 65,3%	2,185	0,068	2,117 = 66,7%	2,770 = 80,2%
c) Alkoholauszug, mg N	1,125	0,091	1,034 = 31,4%	0,930	0,107	0,823 = 26,1%	0,615 = 17,8%
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,200	0,090	0,110 = 3,3%	0,242	0,014	0,228 = 7,2%	0,070 = 2,0%
e) Trockengewicht, mg			54,6			54,8	51,2
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg			55,9			56,3	51,6
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %			20			20	
C. Bäckerhefe in Glucoselösung:							
a) Gesamt-N, mg	3,737	0,189	3,548 = 100%	4,173	0,189	3,984 = 100%	3,477 = 100%
b) Eiweiß-N, mg	2,568	0,026	2,542 = 71,5%	2,723	0,027	2,696 = 67,7%	2,931 = 84,2%
c) Alkoholauszug, mg N	0,934	0,073	0,861 = 24,4%	1,098	0,089	1,009 = 25,3%	0,463 = 13,4%
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,235	0,090	0,145 = 4,1%	0,352	0,073	0,279 = 7,0%	0,083 = 2,4%
e) Trockengewicht, mg			58,5			65,3	94,8
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg			59,4			67,0	95,3
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %			15			20	

Schädigung oder Abtötung der Zelle einhergeht. Da aber in Leitungswasser nach 24stündiger Anfärbung 100% der Zellen rot fluorescieren, müssen 50—60% *reversibel rotfluorochromiert* sein; diese sind nur für die Dauer der Farbstoffeinwirkung als geschädigt zu betrachten. Die Schädigung wird beim Entzug des Farbstoffes wieder aufgehoben, und zwar nach einer gewissen Latenzzeit.

5. Die Beeinflussung des Stickstoffumsatzes.

Bogen und Keser (1954) hatten nachgewiesen, daß in den Hefezellen bei AO-Gegenwart (in Aq.dest.) ein Eiweißabbau eintritt bzw. der Eiweißaufbau beim „turnover" der Proteine verhindert wird. Es erschien notwendig, auch hier den Einfluß der Suspensionsflüssigkeit zu erfassen.

Zur Anwendung kam Bäckerhefe, 1:200 suspendiert in Aq.dest., Leitungswasser und Glucoselösung. Die gefärbten Suspensionen wurden jeweils nach 1 und 24 Std abzentrifugiert, die Kontrollen nur nach 24 Std, nachdem sich herausgestellt hatte, daß sich hier die Werte innerhalb der Versuchszeit nicht ändern. Ergebnisse in Tabelle 6.

Wie bei Bogen und Keser wurde aller N als Eiweiß- bzw. Aminosäure-N bezeichnet, obgleich feststehen dürfte, daß ein Teil auch in anderer Bindung, z.B in Nucleinsäuren u. a., vorliegt. Indessen ist der Anteil dieser Stoffe gering; überdies handelt es sich hier nur um einen Vergleich mit den bereits bekannten Werten.

Der erste Versuch (Tabelle 6, A) mit Aq.dest. als Suspensionsflüssigkeit paßt sich gut in die von Bogen und Keser festgestellten Werte mit den S.D. 1:50 und 1:500 ein. In Tabelle 7 sind die Prozentsätze aller 3 Suspensionsdichten einander gegenübergestellt. Zwar beziehen sich die Werte von Bogen und Keser auf 12-, die hier vorgelegten auf 24stündige Versuchsdauer; da jedoch in Aq.dest. der Eiweißabbau nach 1 Std praktisch beendet ist, erscheint der Vergleich gerechtfertigt. In der letzten Horizontalreihe der Tabelle 7 ist der prozentuale Abbau im Verhältnis zum Resteiweiß der Kontrolle aufgeführt. Die Kontrollen gaben bei allen 3 Suspensionsdichten gleiche Werte.

Tabelle 7. *Eiweißabbau durch AO in Aq.dest. bei den S.D. 1:50, 1:200 und 1:500 nach 12 bzw. 24 Std.*

	1:50	1:200	1:500	Kontrollen
Eiweiß, % N	68,8	52,0	30,2	80,0
Alkoholauszug, % N	24,8	29,5	36,7	18—19
Suspensionsflüssigkeit, % N	2,8	18,5	33,1	1—2
Eiweißabbau durch AO, %	14	35	62,5	

Auch die Wirkung des AO auf den Eiweißabbau und die Permeabilitätsveränderung ist demnach abhängig von der Suspensionsdichte.

In Leitungswasser und Glucoselösung sind Proteinabbau und Permeabilitätserhöhung *geringer* als in destilliertem Wasser. In beiden Fällen erreicht der Eiweißabbau nach 24 Std den *gleichen* Wert von 20%. Während aber in Leitungswasser der Abbau nach 1 Std bereits beendet ist, beginnt er in Glucoselösung mit 15% und steigt erst im weiteren Verlauf des Versuches auf 20% an.

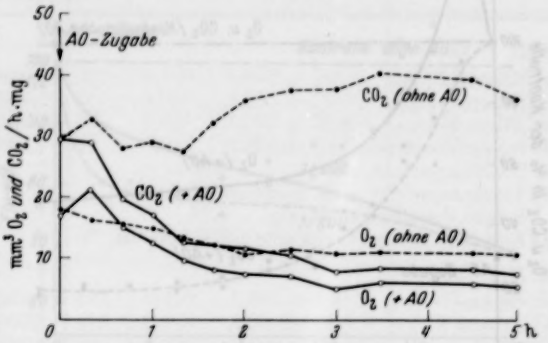


Abb. 18. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe bei Einwirkung von AO auf Bäckerhefe in Glucoselösung. S.D. 1:200. Ordinate: mm³ O_2 bzw. CO_2/Std und 1 mg Hefe; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden nach AO-Zugabe.

6. Die Beeinflussung des Gaswechsels.

Die Beobachtung des Eiweißabbaus führte zu der Frage, ob und in welcher Weise eine Beziehung zum Gaswechsel der Hefezellen besteht. Es war bereits festgestellt worden, daß eine Beeinflussung der Atmung durch Belüftung bzw. Azidzugabe eine Änderung der Farbstoffaufnahme und Anfärbung nach sich zieht; andererseits war es von Bedeutung, die Wirkung des Farbstoffes auf die Atmung zu prüfen.

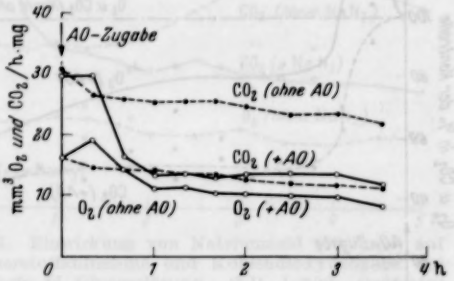


Abb. 19. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe bei Einwirkung von AO auf Bäckerhefe in Glucoselösung. S.D. 1:500. Ordinate: mm³ O_2 bzw. CO_2/Std und 1 mg Hefe; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden nach AO-Zugabe.

a) Die Untersuchung wurde mit Hilfe der WARBURG-Methode durchgeführt. Bäckerhefe wurde in einer Lösung von 1% Glucose in Leitungswasser suspendiert (S.D. 1:200 und 1:500). Die Ausführung der Versuche ist im methodischen Teil beschrieben.

Die Ergebnisse sind in Abb. 18 und 19 graphisch dargestellt. Zur besseren Verdeutlichung wurden ferner auf Abb. 20 und 21 die unter dem Einfluß von AO gewonnenen Werte für die O_2-Aufnahme und die CO_2-Abgabe in *Prozenten der Kontrolle aufgetragen.*

Sofort nach AO-Zugabe findet eine *Steigerung der Sauerstoffaufnahme* um 20% (1:500) bzw. 30% (1:200) statt. Sie fällt nach 20 bis 30 min wieder ab, erreicht nach 45 min den Kontrollwert und sinkt im Verlaufe von 4 Std bis auf 50—60%.

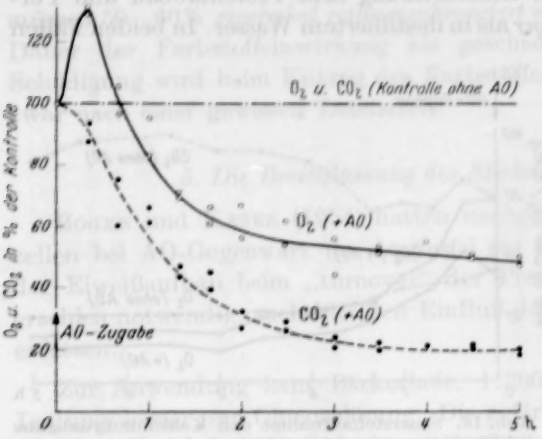


Abb. 20. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe bei Einwirkung von AO auf Bäckerhefe in Glucoselösung. S.D. 1:200. Ordinate: Die unter AO-Einwirkung gemessenen Werte in Prozenten der Kontrollwerte; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

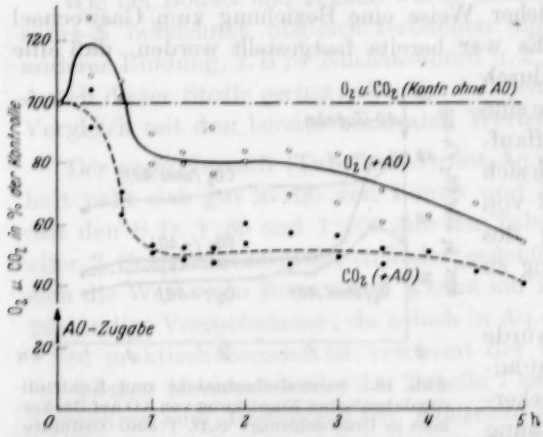


Abb. 21. Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe bei Einwirkung von AO auf Bäckerhefe in Glucoselösung. S.D. 1:500. Ordinate: Die unter AO-Einwirkung gemessenen Werte in Prozenten der Kontrollwerte; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

Die Kohlendioxydabgabe sinkt sofort nach AO-Zugabe auf 20–40%.

Während die O_2-Aufnahme innerhalb der Versuchszeit von anderen Faktoren unbeeinflußt bleiben dürfte, ist in den Gefäßen, in denen die CO_2-Abgabe gemessen wird, mit einer Anreicherung des Gases zu rechnen, die zu einer Verschiebung des Stoffwechsels im Sinne einer gesteigerten CO_2-Abgabe und verminderten O_2-Aufnahme führen kann („Pasteur-Effekt"). Die Beeinträchtigung der CO_2-Entwicklung durch AO dürfte gleichwohl als real anzusehen sein, da der Abfall bereits kurz nach AO-Zugabe eintritt, also zu einer Zeit, in der im Versuchsgefäß mit AO noch die gleichen Bedingungen bezüglich des CO_2- und O_2-Druckes herrschen dürften, wie im Kontrollgefäß ohne AO. Überdies ist dann die CO_2-Konzentration in den AO-Gefäßen *geringer* als in der Kontrolle. Eine Steigerung der CO_2-Produktion in den Kontrollgefäßen ist nur bei der S.D. 1:200 festzustellen, eindurch AO induzierter Abfall jedoch bei beiden Suspensionsdichten. Jedoch geben die Kurven keine Möglichkeit zu einem *quantitativen* Vergleich.

Damit ist nachgewiesen, daß AO nach einer kurzfristigen Steigerung der Sauerstoffaufnahme zu einer Verminderung des Gaswechsels der Hefezellen führt.

b) Um diese Ergebnisse mit denen des Eiweißabbaus vergleichen zu können, wurden die Untersuchungen des N-Umsatzes mit der Mikro-Kjeldahl-Methode unter den gleichen Bedingungen wie bei den Warburg-Versuchen wiederholt.

Bäckerhefe wurde in 1%iger Glucoselösung 1:200 und 1:500 suspendiert, mit AO versetzt und die Kolben mit den Suspensionen in einem Thermostaten horizontal geschüttelt. Kontrollen blieben ohne AO. Nach $^1/_2$, 2 und 5 Std wurden Proben entnommen und diese in der beschriebenen Weise fraktioniert auf den N-Gehalt untersucht. Tabelle 8 enthält die Versuchsergebnisse. In Abb. 22 ist der Eiweißabbau in Prozenten der Kontrolle eingetragen.

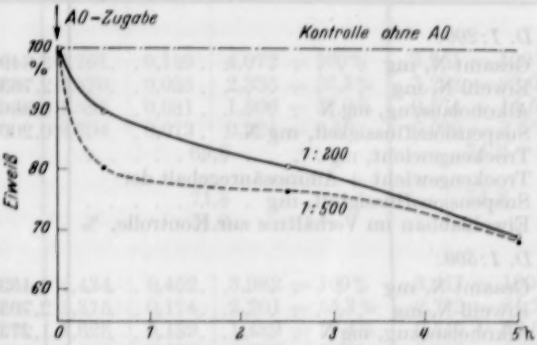


Abb. 22. Eiweißabbau in geschüttelten Suspensionen von Bäckerhefe in Glucoselösung. S.D. 1:200 und 1:500. Ordinate: Eiweiße in Prozenten der unbehandelten Kontrolle; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden.

Beim Vergleich dieser Kurven mit den in Abb. 21 und 20 aufgezeichneten erkennt man sofort deren genaugleichsinnigen Verlauf. Bei der S.D. 1:500 sind die Kurven steil abfallend, Eiweißabbau und Gaswechselhemmung sind 1 Std nach AO-Zugabe maximal. Bei der S.D. 1:200 ist der Verlauf aller 3 Kurven flacher, der Abfall zieht sich über 4—5 Std hin.

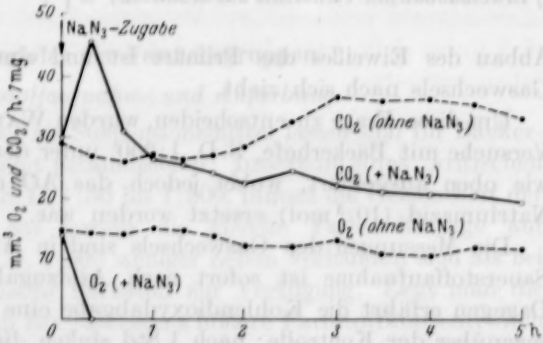


Abb. 23. Einwirkung von Natriumazid (10^{-3} mol) auf die Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe der Bäckerhefe in Glucoselösung. S.D. 1:200. Ordinate: mm^3 O_2 und CO_2/Std und in mg Hefe; Abszisse: Versuchsdauer in Stunden nach AO-Zugabe.

Aus der Übereinstimmung der Kurvenverläufe darf geschlossen werden, daß Eiweißabbau und Beeinflussung des Gaswechsels durch AO in engem Zusammenhang stehen.

c) Es bleibt aber offen, ob verschiedene Angriffspunkte des AO vorhanden sind, ob etwa eine Atmungshemmung den Energiestoffwechsel und damit den Eiweißstoffwechsel beeinflußt oder ob umgekehrt der

Tabelle 8. *Quantitative Bestim-*
Bäckerhefe in Glucoselösung, $^1/_2$, 2 und 5 Std mit AO angefärbt und ungefärbt;

Eigenschaft der Suspensionen	30 min gefärbt		
	Gesamt-N	AO-N	Gesamt-N − AO-N
A. *S.D. 1:200:*			
a) Gesamt-N, mg	3,849	0,189	3,660 = 100%
b) Eiweiß-N, mg	2,763	0,051	2,712 = 74,2%
c) Alkoholauszug, mg N	0,886	0,066	0,820 = 22,4%
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,200	0,072	0,128 = 3,4%
e) Trockengewicht, mg		60,8	
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg		62,1	
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %		10,6	
B. *S.D. 1:500:*			
a) Gesamt-N, mg	4,453	0,452	4,001 = 100%
b) Eiweiß-N, mg	2,703	0,103	2,600 = 65,0%
c) Alkoholauszug, mg N	1,273	0,112	1,161 = 29,0%
d) Suspensionsflüssigkeit, mg N	0,477	0,237	0,240 = 6,0%
e) Trockengewicht, mg		66,1	
f) Trockengewicht + Aminosäuregehalt der Suspensionsflüssigkeit, mg		69,1	
g) Eiweißabbau im Verhältnis zur Kontrolle, %		19,8	

Abbau des Eiweißes das Primäre ist und eine Beeinträchtigung des Gaswechsels nach sich zieht.

Um diese Frage zu entscheiden, wurden Warburg- und Kjeldahl-Versuche mit Bäckerhefe, S.D. 1:200, unter den gleichen Bedingungen wie oben ausgeführt, wobei jedoch das AO durch das Atmungsgift Natriumazid (10^{-3} mol) ersetzt worden war.

Die Messungen des Gaswechsels sind in Abb. 23 dargestellt: Die Sauerstoffaufnahme ist sofort nach Azidzugabe *vollständig gehemmt*. Dagegen erfährt die Kohlendioxydabgabe eine kurzfristige Steigerung gegenüber der Kontrolle; nach 1 Std sinken die Werte dann unter die der Kontrolle.

Der Eiweißstoffwechsel bleibt innerhalb von 2 Std *unbeeinflußt*. Es findet keinerlei Abbau statt. Der intakte N-Umsatz bei völlig sistierter Atmung erlaubt den Schluß, daß bei der AO-Wirkung der *Eiweißabbau die primäre Reaktion* und die *Beeinflussung des Gaswechsels* erst die *Folge* des Eiweißabbaus ist. Dafür spricht auch, daß der Eiweißabbau bei der S.D. 1:500 nach 30 min fast *vollständig beendet* ist, während der Abfall der O_2- bzw. CO_2-Werte erst nach dieser Zeit *beginnt*. Bei der S.D. 1:200 ist diese Erscheinung nicht so augenfällig wegen des langsameren Abfallens der Kurven.

III. Besprechung der Ergebnisse.

Vorangestellt sei eine Übersicht über die wichtigsten Befunde, die sich aus dem Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen ergeben.

mungen des N-Stoffwechsels.
geschüttelt im Thermostaten bei 25° C. S.D. 1:200 und 1:500. Sonst wie Tabelle 6.

2 Std gefärbt			5 Std gefärbt			Ungefärbt
Gesamt-N	AO-N	Gesamt-N −AO-N	Gesamt-N	AO-N	Gesamt-N −AO-N	
4,157	0,189	3,968 = 100%	4,261	0,189	4,072 = 100%	3,961 = 100%
2,693	0,045	2,648 = 66,8%	2,370	0,035	2,335 = 57,3%	3,288 = 83,0%
1,243	0,081	1,162 = 29,3%	1,587	0,081	1,506 = 37,0%	0,574 = 14,5%
0,221	0,063	0,158 = 3,9%	0,304	0,073	0,321 = 5,7%	0,099 = 2,5%
	68,8			69,9		74,2
	70,2			71,8		74,8
	19,5			31,0		
4,316	0,452	3,864 = 100%	4,434	0,452	3,982 = 100%	3,417 = 100%
2,540	0,139	2,401 = 62,2%	2,375	0,174	2,201 = 55,3%	2,773 = 81,2%
1,293	0,124	1,169 = 30,3%	1,628	0,139	1,489 = 37,4%	0,546 = 16,0%
0,483	0,189	0,294 = 7,5%	0,431	0,139	0,292 = 7,3%	0,098 = 2,8%
	63,8			67,2		73,2
	66,8			70,0		73,8
	23,4			31,8		

A. Vergleich der Versuchsgruppen.

1. Farbstoffaufnahme und Anfärbung.

Bei *destilliertem Wasser* als Suspensionsmittel lassen sich für Bäckerhefe beide Prozesse wie folgt parallelisieren: Innerhalb eines „kritischen Bereiches", nämlich der S.D. 1:50 bis 1:500, nimmt die Gesamtheit der Hefezellen *während 24 Std* jeweils die gleiche Farbstoffmenge auf (Abb. 11). Da bei der S.D. 1:500 weniger Zellen vorhanden sind als bei 1:50, steht jeder Zelle mehr Farbstoff zur Verfügung. Legt man die Auffassung zugrunde, daß Rotfluorescenz höhere Farbstoffkonzentration am Adsorptionsort anzeigt, so muß bei geringer Suspensionsdichte der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen höher sein. Das ist aber genau das Ergebnis der Färbebefunde. Analoges tritt bei Reinhefe auf.

Die Verhältnisse sind indessen wesentlich komplizierter, wenn man den *zeitlichen Ablauf* verfolgt: So ist z. B. bei Bäckerhefe innerhalb der ersten Stunde bereits 85% des gesamten (= 95 des innerhalb von 24 Std aufgenommenen) Farbstoffes aus der Suspensionsflüssigkeit verschwunden; in den folgenden 23,5 Std nehmen die Zellen nur noch weitere 5% Farbstoff auf (Abb. 13). Der Prozentsatz der roten Zellen steigt aber im gleichen Zeitraum um *mehr als das Anderthalbfache* an (Abb. 3). Der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen kann daher nicht als Maßstab für die Farbstoffaufnahme dienen.

Vergleicht man daraufhin Bäckerhefe und Reinhefe, beide in Aq. dest., so wird das Fehlen einer strengen Proportionalität noch deutlicher:

Bei Reinhefe ist der Prozentsatz rotfluorescierender Zellen höher (Abb. 10), die Farbstoffaufnahme aber ganz erheblich geringer als bei Bäckerhefe.

In den Leitungswasserversuchen wird die Parallelität ebenfalls vermißt; es erübrigt sich, die Belege noch einmal aufzuführen.

Bereits aus den Versuchen in Leitungswasser und Aq. dest., wo mit einem nennenswerten Stoffumsatz nicht zu rechnen ist, kann also geschlossen werden, daß es *nicht möglich* ist, *allein aus der Anfärbung auf die aufgenommene Farbstoffmenge zu schließen. Ebensowenig läßt sich aus der Farbstoffmenge das Färberesultat voraussagen.*

Wenn man daher untersuchen will, inwieweit der AO-Effekt durch den physiologischen Zustand verändert wird, darf man die Diskussion allenfalls an Hand der Farbstoffaufnahme führen, nicht des optischen Färbebefundes.

Zur Bekräftigung sei auf die in Glucoselösung stattfindende Entfärbung der grünfluorochromierten Zellen hingewiesen. Diese findet in den Farbstoffaufnahmekurven keinen Niederschlag. Ähnlich verhält es sich mit der Entfärbung eines *Teiles* der rotfluorochromierten Zellen: es gibt wenigstens 2 Formen der Rotfluorescenz, von denen die eine bei Glucosezusatz reversibel ist, die andere nicht. Charakteristischerweise wird unter definierten Bedingungen stets der gleiche Prozentsatz der Zellen entfärbt.

Glucosezusatz regt den Kohlenhydratstoffwechsel der Hefezellen an. Die bei der Gärung stattfindende Ansäuerung vermag die verringerte AO-Aufnahme zu erklären (s. S. 346). Bei Belüftung wird eine Atmung induziert: die Gärung nimmt entsprechend ab, die Wasserstoffionenproduktion ist geringer und folglich der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen höher. Dieser Effekt ist jedoch von der mechanischen Beschleunigung der Farbstoffzufuhr durch Verhinderung der Sedimentation überlagert, wie die ebenfalls stark erhöhte Rotfluorochromierung bei Durchlüftung in Leitungswasser zeigt (Abb. 6).

Bei Azidzusatz wird die Atmung verhindert, die CO_2-Produktion kann sogar vorübergehend gesteigert sein. Die Ansäuerung im Zellinnern ist vermutlich noch stärker als in reiner Glucoselösung, und daraus folgt eine Verzögerung der Farbstoffaufnahme (Abb. 8).

Jedoch lassen sich nicht alle Versuchsergebnisse einfach aus der p_H-Änderung in der Zelle allein erklären. In belüfteter Glucoselösung ist der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen um so höher, je später AO der Versuchslösung zugesetzt wird (Abb. 6). Da die Farbstoffaufnahme nicht nur osmotischen Gesetzmäßigkeiten folgt, wird angenommen, daß die nichtosmotischen Prozesse bei erhöhtem Energiestoffwechsel ebenfalls beschleunigt sind und eine stärkere Farbstoffaufnahme bewirken. Anders verhält es sich mit dem reversiblen Auftreten grüner

Zellen mit gelbroten Einschlüssen in durchlüfteter Glucoselösung. Hier besteht die Möglichkeit, daß im Laufe der Stoffwechselvorgänge in der Zelle neue Adsorptionsorte für den Farbstoff gebildet werden, die später wieder verschwinden (s. S. 369).

Ähnliches kann für die gesteigerte Farbstoffaufnahme der Bäckerhefe in Schopfer-Lösung angenommen werden. In N-haltiger Nährlösung werden das Wachstum und das turnover in Gang gesetzt und somit die Zahl der Adsorptionsorte für das AO vermehrt. Die geringe Farbstoffaufnahme der Reinhefe widerspricht dieser Erklärung; sie kann jedoch durch eine geringere Permeabilität der Zellen verursacht sein. Diese Frage ist nicht zu entscheiden, da die Bestimmungen des Proteinabbaus in Nährlösung noch ausstehen. Diese lagen jedoch außerhalb des Rahmens dieser Arbeit, da sie markierte N-Verbindungen erfordert haben würden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine ganze Reihe physikalischer Faktoren, wie z. B. Farbstoffangebot, p_H-Änderungen, Permeabilität u. a., die Farbstoffaufnahme bestimmen. Die Ergebnisse sind jedoch nicht allein auf diese Faktoren zurückzuführen, sondern zeigen an, daß die Anfärbung im wesentlichen von Bedingungen beeinflußt wird, die sich durch den Stoffwechsel der Zellen ergeben, also vom physiologischen Zustand der Zellen abhängen.

2. Das Wachstum.

Bogen (1953) konnte nachweisen, daß AO das Wachstum der Hefezellen hemmt, daß die Hemmung dem Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen *nicht* proportional ist und daß auch grüne Zellen geschädigt sein können.

Aus den hier vorgetragenen Versuchen ergibt sich weiterhin:

a) AO ruft in jedem Falle eine vollständige oder teilweise Hemmung des Wachstums der behandelten Hefezellen hervor.

b) Nach der Übertragung AO-behandelter Zellen in AO-freies flüssiges oder auf festes Nährmedium wird diese Hemmung teilweise oder vollständig wieder aufgehoben oder sogar durch verstärktes Wachstum überkompensiert.

α) Das erneute Wachstum ist abhängig von der *Suspensionsdichte:* Mit der Verringerung der S.D. nimmt der Zuwachs in Nährlösung sowie auch die Zahl der auf Agar gebildeten Kolonien ab (s. S. 354).

Hierin stimmen Wachstums-, Anfärbe- und Farbstoffaufnahmeversuche überein.

β) Unterschreitet die Suspensionsdichte einen bestimmten Wert, so ist der (geringe) Zuwachs, unabhängig von der weiteren Verdünnung der Suspension, stets der *gleiche*; ein Verhalten, das als Selektion zu deuten ist (S. 349).

γ) Das Wachstum ist ferner abhängig von der verwendeten Hefeart. Zwischen Bäckerhefe und daraus isolierter Reinhefe fanden sich Unterschiede sowohl in der Anfärbung als auch in der Wirkung des AO auf das Wachstum. Diese Unterschiede sind nicht zu parallelisieren; über ihre Ursachen können vorerst noch keine Aufschlüsse gegeben werden.

δ) Schließlich ist das Wachstum abhängig von der Zusammensetzung der Suspensionsflüssigkeit. Dabei entspricht wiederum die Zahl der auf Nähragar gebildeten Kolonien dem Prozentsatz der nicht bzw. reversibel rot gefärbten Zellen (s. S. 356).

In Glucoselösung vorgefärbte Zellen unterscheiden sich nicht von solchen aus Leitungswasser. Diese Übereinstimmung findet ihre Erklärung in der Entfärbung der in Leitungswasser reversibel rot gefärbten Zellen nach Übertragung in (glucosehaltige) Nährlösung. Zu den bereits genannten Wirkungen des Glucosezusatzes (Verzögerung der Farbstoffaufnahme, Verzögerung und Verhinderung 100%iger Rotfluorochromierung, Entfärbung der reversibel rotfluorochromierten Zellen und Entfärbung der grünen Zellen) tritt damit noch die partielle Aufhebung der durch AO gesetzten Wachstumshemmung. Vorbehandlung in verschiedenen N-haltigen Lösungen (mit AO-Zusatz) zeigt, daß der Farbstoffzusatz das erneute Wachstum um so stärker hemmt, je intensiver das Wachstum — und damit der N-Umsatz — der ungefärbten Zellen ist (s. S. 351). Reinhefe in vollständiger Nährlösung verhält sich insofern abweichend, als eine *Adaptation* der Hefe an den Farbstoff stattfindet. Diese steht im Zusammenhang mit der äußerst geringen Farbstoffaufnahme bzw. Anfärbung und möglicherweise auch mit dem Auftreten von Oberflächenhefen. Wichtig ist ferner die Tatsache, daß selbst diese geringe Farbstoffaufnahme zu einer vollständigen Sistierung des Wachstums über 24 Std führt (s. S. 348).

3. Der Proteinstoffwechsel.

In Aq.dest. zeigt der Proteinabbau die gleiche Abhängigkeit von der Suspensionsdichte, wie das Wachstum, die Farbstoffaufnahme und die Anfärbung: je geringer die Suspensionsdichte, desto stärker die Schädigung durch AO (s. S. 358).

Diese Abhängigkeit verschwindet, sobald Leitungswasser oder Glucoselösung als Suspensionsmittel verwendet werden. In beiden Fällen ist der Proteinabbau *gleich groß*, aber im Vergleich zum destillierten Wasser *geringer*. Der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen ist in Leitungswasser 100, also höher als in Aq. dest., in Glucoselösung 40, d.h. geringer als in destilliertem Wasser. Rotfluorescenz und Proteinabbau sind mithin voneinander weitgehend *unabhängig*. Ebensowenig ist eine Parallelität zur Farbstoffaufnahme gegeben: Aus Leitungs-

wasser und destilliertem Wasser nehmen die Zellen innerhalb von 24 Std die gleiche Menge AO auf; der Proteinabbau ist jedoch in Leitungswasser geringer. Demgegenüber zeigen Proteinabbau und Wachstum untereinander die *gleichen* Abhängigkeitsbeziehungen; Proteinabbau und Wachstumshemmung sind eng korreliert.

4. Der Gaswechsel.

Die Beeinflussung des Gaswechsels durch AO läßt keine Beziehungen zur Suspensionsdichte erkennen. Da jedoch beim WARBURG-Versuch bereits die AO-freien Kontrollen der S.D. 1:200 und 1:500 nicht unter gleichen Bedingungen gehalten werden können, darf aus dem negativen Befund nicht auf das Fehlen einer Proportionalität zur Suspensionsdichte geschlossen werden. Andererseits verläuft die Hemmung des Gaswechsels parallel dem Proteinabbau (vgl. hierzu S. 361).

Aus den einzelnen Punkten lassen sich folgende Feststellungen treffen:

In destilliertem Wasser und zum Teil noch in Leitungswasser besteht eine gute Proportionalität zwischen Anfärbung, Farbstoffaufnahme, Wachstumshemmung und Proteinabbau einerseits und der Suspensionsdichte andererseits. Dieser rein physikalische Faktor, dem einfach das bei geringer Suspensionsdichte erhöhte Farbstoffangebot zugrunde liegt, ist jedoch keineswegs das einzige Moment, das über das Ausmaß der AO-Effekte entscheidet: Sobald die Zugabe von Nährstoffen in die Suspensionsflüssigkeit die Intensität des Stoffwechsels erhöht, wird die Proportionalität vollständig überdeckt oder sogar aufgehoben. Statt dessen sind Qualität und Quantität dieser Stoffwechselvorgänge maßgebend. Dies aber nicht in dem Sinne, daß allein die Menge gewisser Stoffwechselprodukte (z. B. H-Ionen) die physikalischen Faktoren modifiziert. Vielmehr ist es die Veränderung des „physiologischen Zustandes", der die in den Versuchen gemessenen Phänomene folgen. Dabei wird nunmehr ein enger Zusammenhang zwischen Proteinabbau, Wachstumshemmung und Gaswechselhemmung sichtbar.

B. Vergleich mit den Ergebnissen aus der Literatur.

Wenn diese Fragen nunmehr an Hand der Befunde aus der Literatur besprochen werden sollen, wird es vielfach erforderlich sein, auf die Vorgänge *in der einzelnen Zelle* einzugehen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die hier gemachten Aussagen lediglich statistischer Natur sind, d.h. das Verhalten eines Kollektivs von Zellen betreffen und daher nicht ohne weiteres auf die Einzelzelle bezogen werden können. So besagt z. B. der bei der S.D. 1:500 beobachtete Eiweißabbau weder, daß 63% der Zellen ihr *gesamtes* Eiweiß abgebaut haben, noch daß in *jeder* Zelle 63% ihres Eiweißes verschwunden sind. Gerade hier dürften *intermediäre* Abbaugrade vorliegen (BOGEN und KESER 1954). Dafür spricht unter

anderem, daß die Abbauprozente weder mit dem Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen noch mit dem Prozentsatz der abgetöteten Zellen (Plattenversuche) übereinstimmen. Hier, wie in zahlreichen anderen Fällen, wirken auch physiologische Differenzen *innerhalb der Population* entscheidend mit, wie etwa der Entwicklungszustand zum Zeitpunkt der Anfärbung (unterschiedliches physiologisches Alter).

1. Farbstoffaufnahme und Anfärbung.

Für die Aufnahme des basischen Farbstoffes AO in das Plasma der lebenden Zelle sind, nach der Theorie der Vitalfärbung (z. B. Drawert 1948), folgende physikalische Faktoren maßgebend:

1. Das Farbstoffangebot, das sowohl von der Gesamtmenge des Farbstoffes als auch von dem p_H-abhängigen Verhältnis zwischen seinen Ionen und Molekeln abhängt.

2. Das Farbstoffbindungsvermögen (Speicherungsvermögen) der Plasmabestandteile für Farbionen und undissoziierte Molekeln.

3. Die Permeabilität; diese modifiziert jedoch lediglich den zeitlichen Ablauf der Aufnahme; das Ausmaß bestimmt sie nur dann, wenn sie den Konzentrationsausgleich verhindert.

Die generelle Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme und der Anfärbung von der Suspensionsdichte kann mit dem Faktor „Farbstoffangebot je Zelle" befriedigend erklärt werden. Sobald jedoch die p_H-Abhängigkeit betrachtet wird, reicht diese Erklärung nicht mehr aus; auch bei Einhaltung des für die AO-Färbung „optimalen" p_H-Bereiches (p_H 5—7; Strugger 1940, 1949; Kölbel 1947) wurden erhebliche Unterschiede gefunden. Das ist andererseits verständlich, wenn man berücksichtigt, daß durch die Pufferung des Farbbades lediglich der p_H-Wert der Suspensionsflüssigkeit, nicht aber der des Zellinneren verändert wird. Nach Farrer (1953) ist die Pufferungskapazität von Hefezellen so groß, daß es nur unter extremen, bereits schädigenden Bedingungen möglich ist, die Wasserstoffionenkonzentration in der Zelle von außen her zu beeinflussen.

Mithin dürften die p_H-Änderungen *innerhalb der Zelle* von ausschlaggebender Bedeutung sein. Nach Conway und Downey (1950) liegt der „durchschnittliche" p_H-Wert ruhender Hefezellen bei 5,8. *Bei Glucoseveratmung* sinkt er in der äußeren Zone der Zelle auf 4,2 ab, während er im Zellinneren auf 6,35 ansteigt, und in der Suspensionsflüssigkeit wurden (in den vorliegenden Versuchen) Werte von p_H 4 und darunter gemessen. Es stellt sich also ein nach innen gerichtetes Wasserstoffionengefälle ein; der Farbstoff bewegt sich ihm entgegengesetzt. Damit ist eine physikalische Basis für die Entfärbung grün- bzw. rotfluorochromierter Zellen nach Glucosezugabe gewonnen.

Die Ansäuerung bei Glucoseveratmung beeinflußt aber auch den zweiten Faktor der Farbstoffaufnahme, das Farbstoffbindungsvermögen der Plasmabestandteile: Nach MASSART und Mitarbeitern (1947) treten die H-Ionen mit dem AO in Konkurrenz um die Bindungsorte und vermögen, wenn sie in großer Zahl vorhanden sind, sogar bereits gebundenes AO wieder zu verdrängen. Das muß sich gleichfalls in einer Entfärbung äußern.

Diese Erklärungen versagen indessen, wenn die Vorgänge bei Zugabe von Schopfer-Lösung in Rede stehen, denn hier ist der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen trotz Glucoseveratmung höher als in reiner Glucoselösung. Zieht man ferner in Betracht, daß Bäckerhefe und Reinhefe bei gleichen p_H-Bereichen verschiedenes Anfärbeverhalten zeigen, so wird deutlich, daß der Ablauf der Stoffwechselprozesse nicht allein die quantitativen Voraussetzungen für das Farbstoffbindevermögen schafft, sondern auch die „speichernden Phasen" qualitativ verändert.

Als solche müssen aber vor allem die Nucleinsäuren der Zelle gelten (z. B. GÖSSNER 1950; ZEIGER, HARDERS und MÜLLER 1951; BETZ 1953 für AO; WAGNER-JAUREGG 1943; STICH 1951 u. a. für andere Acridinderivate; weitere Literatur vgl. BOGEN 1953, BOGEN und KESER 1954). Angesichts der überragenden Rolle, die die Nucleinsäuren bei der Entwicklung und beim Stoffwechsel, besonders beim Proteinstoffwechsel, der Zelle spielen (z. B. CASPERSSON 1950), ist es ohne weiteres einleuchtend, daß für die Plasmafärbung Menge und (physiologischer) Zustand der Nucleinsäuren von größerer Wichtigkeit sind, als die oben angeführten Faktoren, die lediglich *Voraussetzungen* für die Anfärbung sind. Diese Auffassung wird in vielen wesentlichen Punkten gestützt durch die hier vorgelegten experimentellen Befunde; es sei nur erinnert an die Proportionalität zwischen Wachstumshemmung und Stoffwechselintensität (S. 367), an die qualitativen Färbedifferenzen insbesondere bei der reversiblen und irreversiblen Rotfluorescenz u. a. m. Andererseits ist es bei der noch durchaus ungenügenden Kenntnis des Nucleinsäureumsatzes in der Zelle nicht befremdlich, daß eine Kongruenz von Farbstoffbindung und Nucleinsäureumsatz vorerst nicht quantitativ erfaßbar ist.

Die Befunde über Auftreten und Verschwinden der rot-gelb gefärbten Einschlüsse können danach nur mit großer Vorsicht interpretiert werden. Es ist nicht ausgeschlossen, daß es sich hierbei um Mitochondrien handelt, wie sie LINDEGREN (1951) für Hefe beschrieben hat und wie sie durch AO gefärbt werden können (BORCHERT und HELMCKE 1950; STOCKINGER 1952 u. a.). Wie BAUTZ und MARQUARDT (1953a und b) und MARQUARDT und BAUTZ (1954) zeigten, steigt deren Zahl bei Belüftung untergäriger Hefe und sinkt bei Azidzusatz zu atmender Hefe. Ein analoges Verhalten von Hefezellen mit gefärbten Einschlußkörpern wurde auf

S. 337 beschrieben, doch reichen die Tatsachen ohne eingehende cytologische Analyse nicht aus, um eine Identifizierung zu sichern. Weitere, hier nicht aufgeführte, experimentelle Befunde sprechen dafür, daß die Einschlußkörper nur einen Teil der Mitochondrien sowie einen Teil der Mikrosomen ausmachen.

Immerhin kann die Tatsache, daß Belüftung die Anfärbung beschleunigt und Azid sie verzögert, nicht nur als direkte Einflußnahme des Energiestoffwechsels auf die Farbstoffaufnahme, sondern auch als Schaffung bzw. Beseitigung farbstoffadsorbierender Zentren gedeutet werden.

2. Das Wachstum.

Eine Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen durch AO und andere Acridinderivate ist eine geläufige Erscheinung, die bereits vielfach beschrieben worden ist. Sie kann so stark ausgeprägt sein, daß vollständige Inaktivierung und Abtötung eintritt (z. B. für Bakterien: Dean und Hinshelwood 1951; Flegel 1953; Stein 1953; für Paramaecien: Borchert und Helmcke 1951; für Hefe: Bogen 1953; weitere Literatur bei Bogen und Keser 1954). Der Wirkungsmechanismus konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Da in letzter Zeit bekannt wurde, daß das AO nachdrücklich in den Proteinumsatz eingreift, soll diese Frage in Abschnitt 3 und 4 behandelt werden.

a) Selektion. Wie aus den auf S. 349 angeführten Versuchen hervorgeht, gibt es auch bei Reinhefe in jeder Suspension einige Zellen, die dem Zugriff des AO entzogen sind; sie überleben und werden unter Umständen sogar zu einem beschleunigten Wachstum veranlaßt. Es kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um mutierte Zellen handelt. Indessen zeigte Marcovich (1953), daß das AO (im Gegensatz zum Euflavin: Ephrussi 1951) wohl toxisch, nicht aber mutagen wirkt. Proflavin, das bei *Bact. lactis aerogenes* ganz ähnliche Effekte zeitigt wie AO an Hefe (Dean und Hinshelwood 1591), ist ebenfalls nicht mutagen; Dean und Hinshelwood sprechen hier von einer Resistenz (-entwicklung), die in einem „training" der Zellen an den Farbstoff bestehe. (Dieses „training" ist vermutlich nicht adaptativer Natur.) Es erscheint daher berechtigt, das Überleben einiger Hefezellen in den oben angeführten Versuchen auf Selektion zurückzuführen.

b) Adaptation. Die auf S. 350 beschriebene Adaptation hat ihr Gegenstück in der Adaptation von *Bact. lactis aerogenes* an *Proflavin*, die Baskett (1951) in Fortführung der Versuche von Dean und Hinshelwood nachwies, wie auch in der Adaptation eines *Coli*-Phagen an 3,5-Diamino-10-methylacridin (Mutsaars 1950). Das Auftreten adaptierter Zellen ist dabei von der Stoffwechselaktivität abhängig.

Es erscheint nicht angängig, diese Adaptation an AO zu parallelisieren mit der Adaptation von Hefezellen an Sauerstoff oder an Nähr-

substrate, wie z.B. Galaktose u. a. (SPIEGELMAN 1951). In diesen Fällen bewirkt der „inducer" eine Umstellung des Stoffwechsels in dem Sinne, daß die Zelle nunmehr den „inducer" selbst *verwerten* kann. Beim AO hingegen werden die adaptierten Zellen befähigt, *trotz* des Stoffwechselgiftes zu wachsen, es entweder unschädlich zu machen oder zu ertragen oder aus den Zellen zu entfernen. Das heißt, sie müssen entweder einen „Entgiftungsmechanismus" aufbauen, oder sie müssen ihren gesamten Stoffwechsel so umstellen, daß er nunmehr die durch AO blockierten Stellen vollständig und glatt umgeht — für beide Ansichten lassen sich einstweilen keine Anhaltspunkte finden. Wahrscheinlicher ist es daher, daß die adaptierten Zellen eine Möglichkeit entwickelt haben, den Farbstoff wieder auszuscheiden (bzw. die höheren AO-Mengen im DELBRÜCK-LURIA-Test gar nicht erst aufzunehmen). An sich kann offenbar jede Hefezelle eine gewisse Menge AO wieder abgeben, wenn sie einen ausgiebigen Kohlenhydrat- und N-Stoffwechsel hat (s. S. 369); das zeigen die Versuche über die Entfärbung von Zellen nach Glucosezusatz und die Einstellung eines „Gleichgewichtes" von 40% roten und 60% grünen bzw. entfärbten Zellen. Die adaptierten Zellen dürften diesen gegenüber befähigt sein, auch größere Farbstoffmengen auszuscheiden.

3. und 4. Proteinstoffwechsel und Gaswechsel.

Bereits BOGEN und KESER (1954) wiesen darauf hin, daß die Vielzahl der AO-Effekte auf einen zentralen Angriffspunkt des Zellgiftes schließen lassen, von dem diese Effekte als sekundär abzuleiten sind, und sie gaben Hinweise für die Hypothese, daß der Farbstoff das Protein-turnover auf der Syntheseseite blockiere (dort auch weitere Literatur). Die hier vorgelegten Befunde stimmen mit den Ergebnissen von BOGEN und KESER vollständig überein und erweitern sie im Hinblick auf die oben angeführte Hypothese. Dabei dürfte von besonderer Wichtigkeit sein, daß sich weder die Proteinstoffwechsel- noch die Gaswechselhemmung mit den Färbeergebnissen parallelisieren läßt, und daß statt dessen eine Übereinstimmung mit den Wachstumsbefunden sichtbar wird. Weiterhin konnte hier gezeigt werden, daß die Hemmung des Proteinstoffwechsels und des Gaswechsels nach gleichsinnigen Kurven verläuft: In der S.D. 1:500 maximale Herabsetzung innerhalb der ersten Stunde, in 1:200 allmählicher Abfall während 5 Std. Eine kleine, aber bemerkenswerte Differenz findet sich, wenigstens bei 1:500, insofern, als die Kurve der Gaswechselhemmung gegenüber der Kurve des Eiweißabbaues zeitlich ein wenig verschoben ist: sie liegt „später" (Abb. 21 und 22). Offensichtlich ist die Hemmung der Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe erst die *Folge* des Proteinabbaus, von dem auch die (Proteine der) Atmungsenzyme betroffen werden.

Diese Auffassung wird bekräftigt durch die Befunde, die EPHRUSSI und Mitarbeiter (1953) und POLLOCK (1953) über die Adaptationserschei-

nungen bei Hefe erhoben haben: Nach Ephrussi und Slonimski (1950) steigt der Cytochromgehalt von Hefekulturen nach Sauerstoffzufuhr innerhalb von 3 Std um 50% gegenüber der unbelüfteten Kontrolle. Acriflavin hingegen hemmt — im Verlaufe dieser Adaptation an den Sauerstoff — spezifisch die *Bildung der Cytochromoxydase* (Slonimski 1953). Dies ist der einzige Angriffspunkt des Acriflavins. Andere („toxische") Acridine verhindern daneben auch noch die Enzymbildung bei maltose- oder galaktoseadaptierenden Hefen. Es liegt nahe, dem AO eine noch breitere Angriffsbasis zuzuschreiben, vor allem, weil das Ausmaß des Proteinabbaus so überraschend hoch ist. Überdies rechnet Marcovich (1953) das AO zu den toxischen Acridinen.

Slonimski nimmt an, daß die Enzymsynthese durch spezifische Oberflächen cytoplasmatischer Partikel (Mitochondrien) katalysiert wird, und daß das Acriflavin mit den Reaktionspartnern bzw. Enzymvorstufen um die spezifischen Oberflächen konkurriert. Pollock (1953) hat diese Vorstellung durch Einführung der sog. SR-Cyclen (self-reproducing cycles) erweitert. Diese SR-Cyclen, die ähnlich dem Tricarbonsäurecyclus funktionieren und zum Teil eine partikuläre Grundlage haben können, produzieren einen Faktor, der zusammen mit einem spezifischen Kernstoff („organizer") die Vorstufe des adaptativen Enzyms bildet. Sauerstoff oder Galaktose oder Maltose als „inducers" lassen dann aus dieser Vorstufe das entsprechende spezifische Enzym entstehen. Die Acridine aber *greifen in diese SR-Cyclen ein* und verhindern so die Ausbildung der Enzyme. Damit ist eine völlige Übereinstimmung mit der Auffassung von Bogen und Keser hergestellt: Das AO verhindert in der Tat die Synthese von Enzymen und zwar augenscheinlich nicht nur von adaptativen, sondern auch von konstitutiven Enzymen und anderen Proteinen, wenn diese nach Maßgabe des turnovers gleichfalls über SR-Cyclen hergestellt werden. Gegenüber den „spezifisch" wirkenden Acridinen, wie Acriflavin, die nur eine oder wenige Enzymsynthesen hemmen (Cytochromoxydase bzw. Malto- oder Galaktozymase), greift das AO in das turnover einer Reihe weiterer Proteinfraktionen ein. Dies erklärt, wieso seine Effekte in so großer Zahl und an so verschiedenen Stellen des Zellgeschehens sichtbar werden. (So sind z. B. die Hemmung des Gaswechsels und die Wachstumshemmung die Folge des Proteinabbaus; daher sind alle 3 Phänomene in ihren experimentell erfaßten Abhängigkeitsbeziehungen parallelisiert.)

Es steht daher zu erwarten, daß die konsequente Anwendung des AO weitere Einblicke in die Mechanismen der Proteinsynthese, der SR-Cyclen usw. ermöglichen wird.

Zusammenfassung.

An Bäckerhefe und einer daraus isolierten Reinhefe wird 1. die Anfärbung mit Acridinorange (AO) fluorescensmikroskopisch kontrolliert,

2. die Farbstoffaufnahme photometrisch bestimmt, sowie der Einfluß des Farbstoffes auf 3. Wachstum (Zellzählung und Plattenkulturen), 4. Proteinumsatz (Mikro-Kjeldahl-Methode) und 5. Gaswechsel (manometrisch nach WARBURG) untersucht. Dabei wird der physiologische Zustand der Hefezellen durch verschieden zusammengesetzte Suspensionsflüssigkeiten (Aq.dest., Leitungswasser, 1%ige Glucoselösung, Nährlösung nach SCHOPFER) verändert und geprüft, inwieweit die oben angeführten Phänomene diesen Änderungen folgen.

1. Anfärbung. In Aq.dest. und Leitungswasser, wo der Stoffwechsel der Zellen nur gering ist, erweist sich der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen, grüner Zellen mit gelbroten Einschlüssen und rein grüner Zellen als abhängig von der Suspensionsdichte und von der Dauer der Farbstoffeinwirkung.

Diese Proportionalität wird meist völlig überdeckt, sobald durch Zusatz von Glucose oder den Komponenten der Schopfer-Lösung zum Suspensionsmittel der Stoffwechsel aktiviert wird: Die Rotfluorescenz ist (bei Bäckerhefe) verzögert, die Zahl der Zellen mit gelbroten Einschlüssen herabgesetzt, die grünen Zellen und ein Teil der rotfluorochromierten Zellen werden *entfärbt*, und schließlich stellt sich ein Gleichgewicht zwischen roten und grünen bzw. entfärbten Zellen ein, das seinerseits von der Suspensionsdichte abhängt. Belüftung und Schütteln der Suspension beschleunigen, Zusatz von Natriumazid verzögert die Rotfluorochromierung.

Zwischen Bäckerhefe und Reinhefe bestehen unter gleichen äußeren Bedingungen erhebliche Färbeunterschiede quantitativer und qualitativer Art. Da es überdies wenigstens zwei verschiedene Formen der Rotfluorochromierung gibt, von denen die eine reversibel, die andere irreversibel ist, wird geschlossen, daß die Anfärbung wesentlich vom physiologischen Zustand der Zellen bestimmt wird. Indessen besteht keine direkte Proportionalität zwischen Stoffwechselaktivität und Anfärbung.

2. Farbstoffaufnahme. Die Gesamtheit aller Zellen einer Suspension (in Aq.dest.) nimmt bei allen Suspensionsdichten nach 24 Std die gleiche Menge Farbstoff auf. Belüftung beschleunigt, Azidzusatz verzögert die Farbstoffaufnahme. Bäckerhefe verhält sich anders als Reinhefe, ebenso führt ein Wechsel des Suspensionsmittels zu erheblichen Unterschieden.

Die Differenzen sind von der Wasserstoffionenkonzentration in der Suspensionsflüssigkeit weitgehend unabhängig; sie können hingegen in manchen Fällen erklärt werden mit der Ansäuerung, die *im Zellinnern* als Folge der Glucoseveratmung einsetzt. Daneben spielen jedoch qualitative Unterschiede in der Menge und im Farbstoffbindungsvermögen der (nucleinsäurehaltigen) Plasmabestandteile, die im Gefolge der Stoffwechselabläufe sich ausbilden, eine überragende Rolle. Davon dürften vor allem die Mitochondrien betroffen werden.

Demgemäß treten bei der Farbstoffaufnahme nur vereinzelt die gleichen Abhängigkeitsbeziehungen zutage, wie bei der Anfärbung: in der Mehrzahl der Fälle sind die beiden Prozesse nicht mehr zu parallelisieren.

3. Wachstum. AO hemmt das Wachstum von Bäckerhefe und Reinhefe in allen Fällen ganz oder teilweise. Diese Hemmung ist in verschiedenen Suspensionsmitteln, bei verschiedenen Stickstoffquellen und bei Bäckerhefe und Reinhefe verschieden. Sie hält am längsten an, wenn die unbehandelten Kontrollen besonders stark wachsen bzw. einen intensiven Eiweißumsatz haben.

Nach Unterschreitung einer bestimmten Suspensionsdichte wird Reinhefe in Aq.dest. abgetötet. Das Überleben einiger weniger Zellen wird als *Selektion* gedeutet.

Ferner kann Reinhefe durch AO-Behandlung in Nährlösung an den Farbstoff *adaptiert* werden (Delbrück-Luria-Test). Die adaptierten Zellen enthalten weniger Farbstoff; sie haben vermutlich die Fähigkeit gewonnen, den Farbstoff in größerer Menge wieder auszuscheiden als die nicht adaptierten Zellen.

4. Proteinabbau. Der Proteinabbau ist ebenfalls von der Suspensionsdichte abhängig. In Glucoselösung und Leitungswasser ist er gleich groß, aber jeweils geringer als in Aq.dest. Dieses Ergebnis findet keinen Niederschlag in den Färbebefunden, da in Leitungswasser der Prozentsatz rotfluorochromierter Zellen höher, in Glucoselösung aber geringer ist als in Aq.dest.

5. O_2-Aufnahme und CO_2-Produktion werden durch AO gleichlaufend mit dem Proteinumsatz gehemmt. Dabei ist aber die Gaswechselhemmung nicht die Ursache des Proteinabbaus, da Zugabe von Azid die O_2-Aufnahme ungefärbter Zellen augenblicklich sistiert, ohne indessen einen Proteinabbau hervorzurufen.

6. Wachstum, Proteinumsatz und Gaswechsel in AO-Gegenwart stimmen untereinander völlig überein, nicht aber oder nur selten mit der Anfärbung und der Farbstoffaufnahme. Da in einigen Fällen gezeigt werden kann, daß der Proteinabbau etwas früher einsetzt als die Gaswechselhemmung, wird vermutet, daß das AO primär den Proteinumsatz blockiert; Gaswechselhemmung und Wachstumshemmung sind dann *Folge*erscheinungen des Proteinabbaus, von dem auch die (Proteine der) Atmungsenzyme betroffen sein dürften.

7. In der Diskussion wird auf die Wirkungsweise des Farbstoffes eingegangen. Es ergeben sich enge Beziehungen zu den Ergebnissen von Ephrussi und Slonimski (Hemmung der Synthese adaptativer Enzyme, insbesondere der Cytochromoxydase, durch Acridine) und Pollock (Blockierung von „self-reproducing cycles").

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Untersuchungen.

Literatur.

Baskett, A. C.: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B **139**, 251—262 (1951). — Bautz, E., u. H. Marquardt: Naturwiss. **40**, 531—532 (1953a); **40**, 532—533 (1953b). — Betz, A.: Planta (Berl.) **41**, 323—357 (1953). — Bogen, H. J.: Arch. Mikrobiol. **18**, 170—197 (1953). — Bogen, H. J., u. M. Keser: Physiol. Plantarum (Copenh.) **7**, 446—462 (1954). — Borchert, R., u. J. G. Helmcke: Naturwiss. **37**, 565 (1950); **38**, 48 (1951). — Bukatsch, F., u. M. Haitinger: Protoplasma (Berl.) **34**, 515—523 (1940). — Caspersson, T. O.: Cell growth and cell function. New York 1950. — Chibnall, A. Ch.: Protein metabolism in the plant. New Haven 1939. — Conway, E. J., and M. Downey: Biochemic. J. **47**, 355—360 (1950). — Dean, A. C. R., and C. Hinshelwood: Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B **139**, 236—250 (1951). — Dixon, M.: Manometric methods, 3. Aufl. Cambridge 1951. — Drawert, H.: Z. Naturforsch. **3**b, 111—120 (1948). — Ephrussi, B.: Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms. Their bearing in cell heredity and differentation. Oxford 1953. — Ephrussi, B., and H. Hottinguer: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**, 75—85 (1951). — Ephrussi, B., et P. P. Slonimski: C. r. Acad. Sci. Paris **230**, 685—686 (1950). — Fales, F. W.: J. of biol. Chem. **202**, 157—167 (1953). — Farrer, K. T. H.: Austral. J. exper. Biol. a. Med. Sci. **31**, 577—582 (1953). — Flegel, H.: Zbl. Bakter. I. **159**, 342—354 (1953). — Gebelein, H., u. H. J. Heite: Statistische Urteilsbildung. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951. — Gössner, W.: Verh. dtsch. Ges. Path. (33. Tagg. Kiel) **1950**, 102—109. — Klingmüller, V.: Z. analyt. Chem. **131**, 17—24 (1952). — Kölbel, H.: Z. Naturforsch. **2**b, 382—392 (1947). — Lindegren, C. C.: The yeast cell, its genetics and cytology. St. Louis 1949. — Loofbourow, J. R.: Biochemic. J. **41**, 119—122 (1947). — Loofborouw, J. R., S. Oppenheim-Errera, D. G. Loofbourow and C. A. Yeats: Biochemic. J. **41**, 122—129 (1947). — Marcovich, H.: Ann. Inst. Pasteur **85**, 199—216 u. 443—450, (1953). — Marquardt, H., u. E. Bautz: Naturwiss. **41**, 361—362 (1954). — Massart, L., G. Peters, J. de Ley and R. Vercauteren: Experientia (Basel) **3**, 288—289 (1947). — Menke, W.: Z. Bot. **32**, 273—295 (1938). — Mutsaars, W.: Nature (Lond.) **165**, 397 (1950). — Pirson, A., C. Tichy u. G. Wilhelmi: Planta (Berl.) **40**, 199—253 (1952). — Pollock, M. R.: 3. Symp. Soc. gen. Microbiol., Cambridge 1953, 150—177. — Slonimski, P. P.: 3. Symp. Soc. gen. Microbiol., Cambridge 1953, 76—94. — Spiegelman, S.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**, 87 (1951). — Stein, W.: Naturwiss. **40**, 26 (1953). — Stich, H.: Naturwiss. **38**, 435 (1951). — Stockinger, L.: Z. mikroskop.-anat. Forsch. **59**, 304—325 (1952). — Strugger, S.: Jena. Z. Naturwiss. **73**, 96—134 (1940).— Flora (Jena) **137**, 73—94 (1944). — Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover 1949. — Umbreit, W. W., R. H. Burris and J. P. Stauffer: Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism. Minneapolis 1947. — Wagner-Jauregg, Th.: Naturwiss. **31**, 335 (1943). — Webb, A. M., and J. R. Loufbourow: Biochemic. J. **41**, 114—119 (1947). — Zeiger, K., H. Harders u. W. Müller: Protoplasma (Wien) **40**, 76—84 (1951).

Prof. Dr. Hans J. Bogen, Braunschweig,
Botanisches Institut der Technischen Hochschule,
Dr. Ulrich Elste, Essen, Blumenthalstr. 4.

Planta, Bd. 45, S. 376—378 (1955).

Aus dem Staatsinstitut für Angewandte Botanik, Hamburg.

Kurze Mitteilung.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER TAGESPERIODISCHE SCHWANKUNGEN IM GEHALT AN FLAVONOLEN BEI *FAGOPYRUM*-ARTEN.

Von

ILSE ESDORN und GERTRUD NÖLL.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 5. März 1955.)

Seit über 30 Jahren finden sich in der Literatur Angaben darüber, daß der Wirkstoffgehalt der Arzneipflanzen tagesperiodischen Schwankungen unterworfen ist. Die Ergebnisse sind aber sehr widersprechend und müssen in den meisten Fällen als nicht gesichert angesehen werden. In neuerer Zeit hat besonders HEGNAUER die bestehenden Unklarheiten diskutiert.

Im Verlauf von Untersuchungen über den Flavonolgehalt in *Fagopyrum* wurden auch tagesperiodische Versuche durchgeführt, über die im folgenden kurz berichtet werden soll.

Versuchsmethodik.

Als Versuchspflanzen dienten *Fagopyrum esculentum* MOENCH und *Fagopyrum tartaricum* GÄRTNER aus dem Botanischen Garten Hamburg (humoser, ungedüngter Sand).

Die Untersuchungen wurden 1953 und 1954 und meistens an zwei oder drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Ernte erfolgte dreimal am Tag.

Als Bezugsgröße wurde der Rohfasergehalt zugrunde gelegt, der nach dem Verfahren von SCHARRER-KÜRSCHNER in der Fassung von ENGI (zit. bei SCHNEIDER 1950) ermittelt wurde. Vergleichsweise wurde auch das Frischgewicht und absolute Trockengewicht herangezogen.

Zur Bestimmung des Flavonolgehaltes wurden die Blätter sofort nach der Ernte abgestreift und anschließend mit Methanol extrahiert. Aus dem die Gesamtflavonole enthaltenden Extrakt wurde das Rutin papierchromatographisch abgetrennt. Die quantitative Bestimmung des Rutins und des Gesamtflavonols erfolgte photometrisch mit Hilfe des Elektrophotometers Elko II nach HÖRHAMMER und HAENSEL 1951 (Einzelheiten vgl. NÖLL 1955).

Ergebnisse.

Sämtliche Versuchsreihen verliefen in beiden Untersuchungsjahren gleichsinnig. Sie zeigten, entgegen den Angaben von NICK, deutlich das Vorhandensein einer Tagesperiodizität. Diese war stets festzustellen, unabhängig davon, ob als Bezugsgröße der Rohfasergehalt, das Frischgewicht oder das Trockengewicht zugrunde gelegt wurde, wobei allerdings beim Rohfasergehalt die eindeutigsten Ergebnisse erzielt wurden.

Die Abb. 1 bringt einige Versuche des Jahres 1954.

Übereinstimmend nimmt sowohl der Gesamtflavonol- als auch der Rutingehalt vom Morgen bis zum Abend zu, um über Nacht wieder

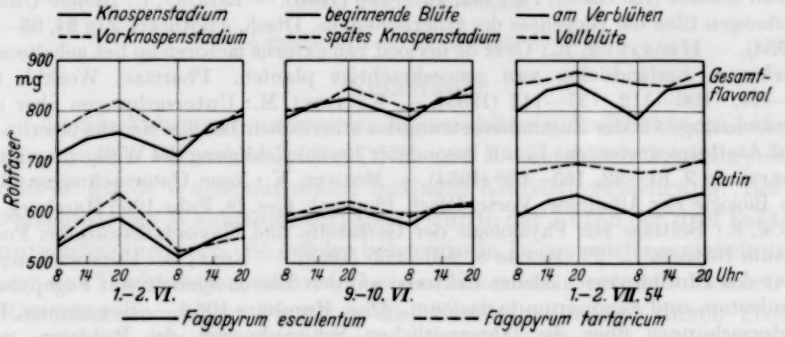


Abb. 1. Tagesperiodische Schwankungen im Flavonolgehalt der Blätter von Fagopyrumarten.

deutlich zu fallen. Dies trifft für den Gehalt der Blätter sowohl bei *Fagopyrum esculentum* als auch bei *Fagopyrum tartaricum* zu. Allerdings ist die Größe der Schwankungen bei beiden Arten in den drei Versuchsreihen etwas unterschiedlich. Ein Vergleich mit den meteorologischen Daten der Versuchstage ergab weder in bezug auf Niederschlagsmenge, Sonnenscheindauer noch auf Temperatur eine eindeutige Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten. Wahrscheinlich ist hierfür in erster Linie das Alter und Entwicklungsstadium der Pflanzen verantwortlich zu machen. So wurde eine ähnliche Abhängigkeit in der Bildung von Sekundärprodukten von MOTHES bei Alkaloidpflanzen und von ESDORN und KALITZKI bei aromatischen Pflanzen festgestellt. Auch die absolute Zunahme im Gehalt an Flavonolen ist vermutlich dem verschiedenen Entwicklungsstadium der Pflanzen zuzuschreiben, denn wie schon von anderer Seite gefunden wurde (COUCH, NAGHSKI u. KREWSON), nimmt der Rutingehalt bis zur Blüte zu.

Bei der im obigen festgestellten regelmäßigen Zu- und Abnahme der Flavonole, die eindeutig dem täglichen Tag- und Nachtwechsel folgen, muß ein entscheidender Einfluß dem Licht zugeschrieben werden. Dies geht auch aus Untersuchungen von NICK und von NÖLL bei verschieden starker Belichtung der Versuchspflanzen hervor. NÖLL stellte auch

einen Abbau des Flavonolgehaltes beim Welken von Fagopyrumblättern fest, wobei der Abbau beim Welken im Dunkeln sich schneller vollzog als im Hellen. Da ferner sowohl Nick als auch Nöll eine erhöhte Bildung von Flavonolen durch Kohlenhydratfütterung erzielten, darf geschlossen werden, daß die Bildung des Glykosides Rutin und seines Aglykons Quercetin in engem Zusammenhang mit der Photosynthese steht.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Förderung der Untersuchungen.

Literatur.

Couch, J. F., J. Naghski and Ch. F. Krewson: Buckwheat as a source of rutin. Science (Lancaster, Pa.) **103**, 197—198 (1946). — Esdorn, I.: Neuere Untersuchungen über die Biogenese der ätherischen Öle. Dtsch. Apotheker-Ztg **94**, 95—97 (1954). — Hegnauer, R.: Over de invloed van externe factoren op het gehalte aan werkzame bestanddelen van geneeskrachtige planten. Pharmac. Weekbl. **88**, 69—79, 106—112, 137—143 (1953). — Kalitzki, M.: Untersuchungen über die Veränderungen in der Zusammensetzung des ätherischen Öles von Mentha piperita L. und Anethum graveolens L. mit besonderer Berücksichtigung des Welkevorganges. Pharmazie **9**, 61—82, 155—166 (1954). — Mothes, K.: Neue Untersuchungen über die Biologie der Alkaloide. Vortr. Dtsch. Pharmak. Ges. 28. Febr. 1955 Hamburg. — Nick, E.: Beiträge zur Physiologie der Gerbstoffe und Flavonfarbstoffe bei Polygonum Bistorta L. Pharmazie **8**, 940—950 (1953). — Nöll, G.: Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Faktoren auf den Flavonolgehalt von Fagopyrum esculentum und Fagopyrum tartaricum. Diss. Hamburg 1955. — Schneider, R.: Untersuchungen über die jahreszeitlichen Schwankungen des Rohfaser- und Ligningehaltes einiger Blatt- und Krautdrogen. Diss. E. T. H. Zürich 1950.

Prof. Dr. Ilse Esdorn, Hamburg, Staatsinstitut für Angewandte Botanik.
Apothekerin Gertrud Nöll, Hamburg, Staatsinstitut für Angewandte Botanik.

Planta, Bd. 45, S. 379—394 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn.

KERN- UND NUCLEOLENWACHSTUM BEI ENDOMITOTISCHER POLYPLOIDISIERUNG.

(EIN BEITRAG ZUR KARYOLOGISCHEN ANATOMIE VON *PEDICULARIS PALUSTRIS* L.)

Von

KURT STEFFEN.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 21. Januar 1955.)

Einleitung.

An der Volumenzunahme des Kernes können drei Faktoren beteiligt sein: 1. die Vermehrung der DNS und 2. die durch Proteinsynthese oder 3. durch Wasseraufnahme bedingte Kernsaftvermehrung. Bei den verschiedenen Wachstumsvorgängen dürfte der Anteil der drei Faktoren unterschiedlich sein. So erfolgt bei gewissen Degenerationserscheinungen nur eine Hydratation, während bei den Eikernen, Dotterstockkernen und Riesenkernen einiger Protisten das Kernvolumen nur durch Proteinsynthese ohne Chromatinvermehrung zunimmt (SCHRADER u. LEUCHTENBERGER 1950). Wenn auch heute schon einiges über die wechselnde Beteiligung dieser drei Faktoren an der Volumenzunahme des Kernes ausgesagt werden kann, so ist über die Beziehung dieser drei Faktoren zueinander und ihre gegenseitige Abhängigkeit voneinander kaum etwas bekannt.

Bei der Zunahme des Kernvolumens im Zusammenhang mit der endomitotischen Polyploidisierung werden drei Vergrößerungsphasen unterschieden: 1. die prä-endomitotische Volumenzunahme des diploiden Ursprungskernes, 2. die für die Endomitosecyclen charakteristische, als „rhythmisches Kernwachstum" bezeichnete Volumenzunahme und 3. die post-endomitotische Vermehrung der Kerngrundsubstanz, die sich „durch Auseinanderrücken der chromatischen Bestandteile, schmierige Beschaffenheit des Heterochromatins und Verringerung des Nucleolusvolumens" (TSCHERMAK-WOESS u. HASITSCHKA 1953, S. 594) auszeichnet.

Mit dem Endomitosecyclus unmittelbar gekoppelt ist die zweite Vergrößerungsphase. Sie wird deswegen zusammen mit der Zunahme der chromatischen Substanz als ein verläßliches Kriterium für die bei pflanzlichen Objekten ablaufenden maskierten Endomitosen angesehen. Dieses Kriterium ist überall dort von ausschlaggebender Bedeutung, wo weder spontane Mitosen im Anschluß an die endomitotische Polyploidisierung

vorkommen, noch Mitosen induziert werden können. Eine exakte Bestimmung des Polyploidiegrades ist überhaupt nur auf dem Wege der möglichst genauen Volumenbestimmung und der statistischen Auswertung der sich dabei ergebenden Volumenklassen möglich.

Die erste Vergrößerungsphase ist bisher nicht näher untersucht worden. Es sollte jedoch ein besonderes Anliegen der Cytomorphologen sein, gerade diese Phase messend zu erfassen und die cytologischen Zustände vor und bei Beginn der Endomitose zu studieren. Damit würde wenigstens die morphologische Grundlage für eine spätere physiologische Erforschung der Endomitoseauslösung geschaffen.

Die Volumenzunahme während der dritten Phase kann durch Proteinsynthese oder durch „unechtes Wachstum" im Sinne von GEITLER (1953, S. 63), also durch Hydratation bedingt sein. Die hierbei auftretenden Änderungen der Kernstruktur lassen sich wohl zunächst als funktionell bedingt auffassen, dürften aber in manchen Fällen einen gleitenden Übergang in die Desorganisationsphase zeigen. Solche Sekundärerscheinungen können auch an nichtpolyploidisierten Kernen auftreten und sollen nach GEITLER nicht vom Kern ausgehen, sondern der „Ausdruck übergeordneter Faktoren" sein, „welche die Zell- und Gewebedifferenzierung beherrschen" (GEITLER 1953, S. 64). Diese Sekundärveränderungen sollen hier unberücksichtigt bleiben.

Die bisher veröffentlichten Beobachtungen und Messungen beschränken sich auf die Endomitosestrukturen der zweiten Wachstumsperiode und vernachlässigen das Verhalten des Nucleolus. Der Nucleolus ist jedoch nach der Auffassung von CASPERSSON durch seinen RNS-Gehalt und die Abgabe von RNS oder RNS-Bausteinen an das Cytoplasma in die Kern-Plasmarelation einbezogen. Mit steigendem Nucleolusvolumen müßte demnach die Potenz zur RNS-Abgabe steigen und damit Plasmawachstum in erhöhtem Maße induziert und das Zellvolumen erhöht werden. Das Nucleolusvolumen aber müßte im Zuge der Endopolyploidisierung zunehmen, da durch die Endomitosecyclen die nucleoluskondensierende Substanz jeweils verdoppelt wird.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, das Verhalten des Nucleolus während der Endomitose zu studieren und zu prüfen, ob eine mit dem rhythmischen Kernwachstum gekoppelte Zunahme des Nucleolusvolumens erfolgt.

Eigene Untersuchungen.

A. Technik.

Die Untersuchungen wurden an Mikrotomschnitten durch Samenanlagen von *Pedicularis palustris* ausgeführt. Die Schnitte wurden mit der normalen Paraffintechnik in einer Schnittdicke von 8—15 μ hergestellt und mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN oder der FEULGENschen Nuclealreaktion gefärbt. Die Fixierung erfolgte mit einer modifizierten NAWASHIN-Lösung. Die Messung der Kern- und

Nucleolusvolumina wurde mit dem Mikrometerokular von LEITZ 1:12,5 und Ölimmersion vorgenommen. Die dritte Dimension wurde durch Drehen der Mikrometerschraube des Mikroskop-Feintriebes ermittelt. Die Berechnung der Volumina erfolgte nach der Inhaltsformel für die Kugsl und der für das zwei- oder dreiachsige Rotationsellipsoid. Von dem Nucleolusvolumen wurden die Volumina der Nucleolusvacuolen subtrahiert. Dabei ergibt sich jedoch nur eine geringe Veränderung der ursprünglichen Werte, so daß in Zukunft von der Bildung der Differenz abgesehen werden kann. Die Zeichnungen wurden mit dem großen ABBEschen Zeichenapparat bei 2750facher Vergrößerung (Fluoritsystem LEITZ 114:1, n. A. 1,32) hergestellt. Die P-Wertbestimmung erfolgte nach der Tabelle von KUCKUCK u. MUDRA (1950).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft dankt der Verfasser für apparative Unterstützung und Herrn Dr. SCHÄFER für Beratung bei der statistischen Auswertung.

Bezüglich der Endomitoseliteratur wird auf die Handbuchbearbeitung GEITLERS (1953), auf das Sammelreferat von D'AMATO (1952) und auf die letzten Arbeiten von TSCHERMAK-WOESS und deren Mitarbeiter (1953, 1954) verwiesen, in denen eine erschöpfende Darstellung und Literaturaufstellung zu finden sind. Hinsichtlich der Embryologie von *Pedicularis palustris* wird auf die Arbeit von SCHMID (1906) und die von BERG (1954) an *Pedicularis silvatica* hingewiesen. Letztere behandelt die ältere Literatur ausführlich und kritisch.

B. Beobachtungen.

I. Embryologie.

Die Samenanlage von *Pedicularis palustris* ist wie die von *Pedicularis silvatica* (BERG 1954, dort weitere Lit.) campylotrop, unitegmisch und tenuinucellat. Der Embryosack entwickelt sich nach dem Normaltyp. Die innere Epidermis des Integuments wird als Endothel (= Tapetum) ausgebildet. Das Endosperm ist cellulär. Es entwickeln sich ein zweikerniges chalazales und ein sehr agressives, vierkerniges mikropylares Endospermhaustorium. Das mikropylare Haustorium bildet einen lateralen Ast, in den die vier Kerne einwandern. Das chalazale Haustorium degeneriert frühzeitig, etwa zur Zeit der Seitenastbildung im mikropylaren Haustorium. In den so entstandenen Hohlraum wachsen propfförmig Endospermzellen ein, deren Kerne endomitotische Polyploidisierung zeigen. Diese Zellen könnten als sekundäre Haustoriumzellen bezeichnet werden. Sie ähneln den bei *Veronica arvensis* und *V. teucrium* beschriebenen (STEFFEN 1954), für die Polyploidie nachgewiesen werden konnte, und den bei *Teedia lucida* (CRÉTÉ 1952), *Selliera* (ROSÉN 1937) und *Globularia vulgaris* (ROSÉN 1940) beobachteten Zellen mit Haustorialcharakter. Bei *Pedicularis palustris* sind diese Zellen jedoch durch die Beschränkung auf den beengten Raum des früheren Chalazalhaustoriums nicht so groß und abgerundet. Auch im Bereich des mikropylaren Haustoriums bildet sich ein gegen das Haustorium vordringender Endospermpflock. Jedoch ist dieser Gewebekomplex kleiner als der im chalazalen Bereich, und seine Kerne weisen einen geringeren Polyploidiegrad auf.

Das mikropylare Haustorium wird durch Cellulosebalken, die im Cytoplasma gebildet werden, ausgesteift, so daß es auch nach Turgorverlust nicht kollabieren kann und als spongiöser Anhang noch am reifen Samen sichtbar ist. Vielleicht vollzieht sich auch im mikropylaren Haustorium von *Pedicularis palustris* wie bei dem von *P. silvatica* (BERG 1954) ein Funktionswechsel. Bei *Pedicularis silvatica* funktioniert das ausgesteifte Haustorium am reifen Samen als Elaiosom. Die Myrmekochorie konnte für diese Art nachgewiesen werden (BERG 1954).

Auch im Endothel des reifenden Samens scheint ein Funktionswechsel vor sich zu gehen. Die an das Endosperm angrenzenden Zellwände werden bis zu einer maximalen Dicke von 7 μ verdickt und kutinisiert. Die Zellwände der angrenzenden Endospermzellen sind nur geringfügig (2 μ) verdickt. Die Testa des reifen Samens baut sich aus der eben erwähnten, aus dem Endothel entstandenen Cutinlamelle, aus der Epidermis und aus der Celluloselamelle auf. Letztere wird von den degenerierten Integumentzellen gebildet.

II. Endomitose.

1. Vorkommen. Das Endothel wird nach vier Endomitosecyclen maximal 32-ploid. Eine zweite Endopolyploidisierungswelle läuft im triploiden Endosperm ab, dessen an die Haustorien grenzende Zellen im mikropylaren Bereich hexaploid und im chalazalen Bezirk meist 12-ploid werden. Beide Endomitosereihen sind an der unterschiedlichen Zahl der SAT-Chromocentren kenntlich. In den Endothel- und Nucelluskernen sind 4 und in den Abkömmlingen des Endosperms 6 SAT-Chromocentren sichtbar.

Während der Nachweis des Polyploidiegrades in den eben genannten Fällen durch Beobachtung der aufeinanderfolgenden Endomitosecyclen exakt geführt werden kann, ist er in den Haustorialkernen nur schätzbar. Für die statistische Sicherung des rhythmischen Kernwachstums reicht das vorhandene Material an Haustorienkernen nicht aus. Die kleinen Kerne des Chalazalhaustoriums dürften etwa 96-ploid, die größeren des mikropylaren Haustoriums etwa 192—384-ploid werden. Die Cytologie und Funktion von primären und sekundären Haustorien, insbesondere die Veränderungen der Kernstruktur, sollen an anderer Stelle zusammenfassend dargestellt werden. In folgendem wird die im Endothel ablaufende Endomitose analysiert und statistisch ausgewertet. Die Entdeckung endomitotischer Feinstrukturen im Endothel geht auf noch unveröffentlichte Beobachtungen von ULRICH zurück.

Im Endothel und den 3—4 angrenzenden Nucelluslagen erfolgt nach Ablauf des Zellteilungswachstums die endomitotische Polyploidisierung. Spontane, unmittelbar an die einzelnen Endomitosecyclen anschließende Mitosen wurden nicht beobachtet und konnten auch nicht induziert

werden. Der Nachweis der Endomitose kann also nur durch die Strukturanalyse, durch die rhythmische Wiederkehr und die Zunahme der chromatischen Substanz, die beide mit dem rhythmischen Kernwachstum gekoppelt sind, erbracht werden. Die Zunahme der chromatischen Substanz läßt sich photospektrometrisch quantitativ erfassen oder kann, wie hier, bei Fehlen einer entsprechenden Einrichtung durch Strukturanalyse und Zeichnungen belegt werden.

Das Endothel wird maximal 32-ploid, meist nur 16-ploid, die angrenzenden 3—4 Zellagen des Nucellusgewebes jedoch nur oktoploid. Dabei läßt sich ein Gradient von außen nach innen feststellen, die äußeren Zellen weisen den geringsten Polyploidiegrad auf. Im Endothel selbst werden meist Ruhekerne von zwei Größenkategorien und Endomitosekerne einer oder selten zweier Größenklassen beobachtet. Im anschließenden Nucellusgewebe finden sich je nach Höhe des Polyploidiegrades im Endothel, also je nach der Dauer des Polyploidisierungsvorganges bis zu drei verschiedene Größenklassen von endomitotischen Ruhekernen.

2. Strukturanalyse. Vor Beginn der Endomitose vergrößern die Endothel- und Nucelluskerne ihr Kern- und Nucleolusvolumen. Gleichzeitig nimmt die chromatische Substanz zu (vgl. Abb. 1a u. b). Die neu aufgetretenen Chromomeren bilden mit den bereits früher sichtbaren heterochromatischen Teilen lockere Chromocentren (Abb. 1b).

a) Interphasekern. In den endomitotischen Interphasekernen von *Pedicularis palustris* treten zwei sich unterschiedlich verhaltende Chromocentren auf, die großen lockeren, peripher gelegenen und die vier kleinen, dem Nucleolus eng anliegenden SAT-Chromocentren (Abb. 1e, f, g). Die Endothelkerne sind zum Typ der Kerne mit lockeren, in Chromomeren gegliederten Chromocentren (= Typ 3 nach Tschermak-Woess u. Hasitschka 1953) zu rechnen. Im endomitotischen Interphasekern sind die Chromomeren leicht heterochromatisch verklebt (Abb. 1b, d, f, h, k), in den Stadien der endomitotischen Teilung tritt ein feinkörniger Bau auf (Abb. 1c, e, g und i). Die Verklebungstendenz der Chromomeren im Interphasekern von *Pedicularis palustris* ist etwas geringer ausgeprägt als bei *Urtica caudata* (Tschermak-Woess u. Hasitschka 1953), der die Kernstruktur sonst ähnelt. Besonders bei höheren Polyploidiegraden (Abb. 1f, h und k) sind die zu kleinen Heterochromatinschollen verbackenen Chromomeren deutlich sichtbar. Von diesen Schollen ausgehend, verlaufen strahlenförmig Körnchenketten, wobei zwischen den einzelnen Körnchen zuweilen anucleale Fibrillen sichtbar werden. Wenn die Körnchen dem Sprachgebrauch der endomitotischen Literatur folgend als „Chromomeren" bezeichnet werden, so geschieht dies mit der stillschweigenden Einschränkung, daß die Identität der Körnchen mit den Pachytänchromomeren nicht gesichert

ist. Der DNS-Gehalt der Chromomeren nimmt von den scholligen heterochromatischen Verklebungsstellen ausgehend gegen die Strahlenenden zunehmend ab. Ob dieser graduelle Unterschied eine Unterscheidung in hetero- und euchromatische Chromomeren erlaubt, scheint dem Verfasser fraglich zu sein. Der zuweilen in der Literatur verwendete Ausdruck: „Übergangschromomeren" dürfte sich bei dieser Sachlage ebenfalls erübrigen.

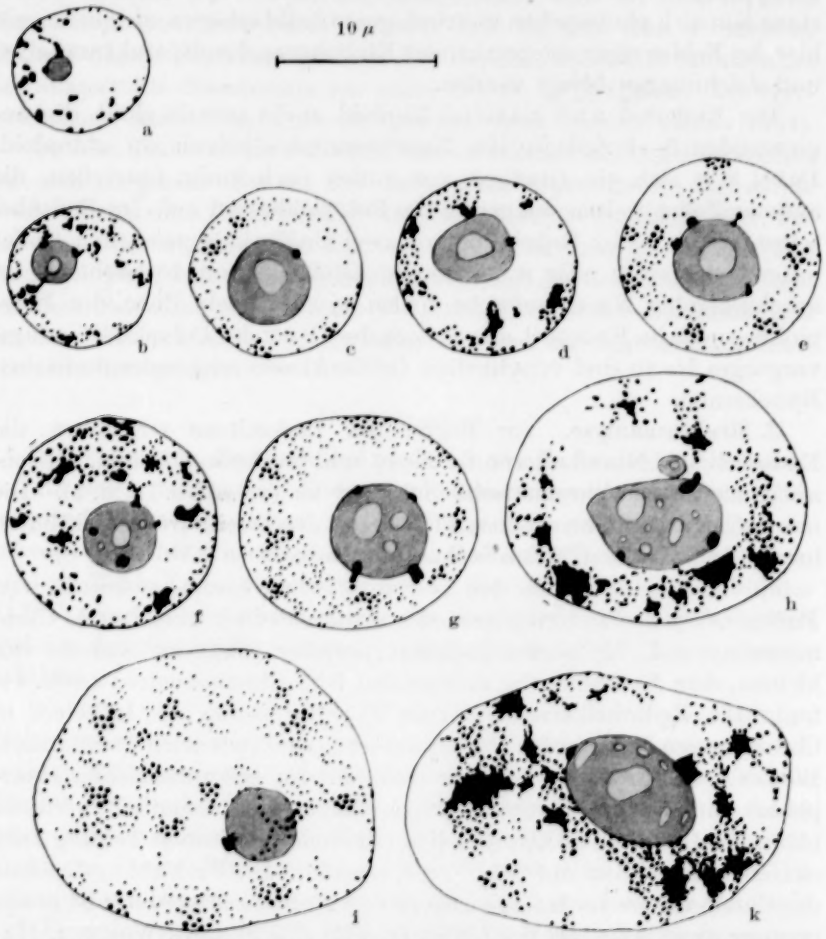


Abb. 1 a—k. *Pedicularis palustris*, Samenanlage. a Nucelluskern, b—k Kerne aus dem Endothel. Endomitotische Interphasekerne: b diploid, d tetraploid, f oktoploid, h 16-ploid und k 32-ploid. Kerne mit endomitotischer Teilungsstruktur: c 1. Endomitose, e 2. Endomitose, g 3., und i 4. Endomitose.

Die dem Nucleolus anliegenden SAT-Chromocentren sind größer als die Chromomeren, aber kleiner als die scholligen Chromocentrenteile.

Sie haben einen unregelmäßigen Umriß, sind aber nicht in Chromomeren gegliedert.

Eine exakte Unterscheidung zwischen Endo-Telo- und Endo-Interphasekernen, wie sie TSCHERMAK-WOESS (1954) für *Sauromatum* angibt, ist bei *Pedicularis* unmöglich. Die auch bei *Pedicularis* beobachteten geringfügigen Strukturänderungen dürften innerhalb der zum Teil auch fixierungsbedingten Streuung biologischer Strukturen liegen, auch scheint es dem Verfasser schwierig zwischen einer späten Prophase und einer Telophase des vorigen Endomitosecyclus zu unterscheiden. Deswegen werden bei der späteren Volumenbestimmung alle Grobstrukturen als Interphasekerne gewertet.

b) Endoprophase. Während der endomitotischen Prophase erfolgt eine Volumenvergrößerung des Kernes um die Hälfte. Der Kern behält im Gegensatz zu *Sauromatum* (TSCHERMAK-WOESS 1954) seinen regelmäßigen Umriß bei. Die SAT-Chromocentren verändern ihre Form nicht, zeigen keine Vacuolisation und bleiben kompakt. Der Nucleolus ist gegenüber dem des Ruhekernes vergrößert. Eine vermehrte Tendenz zur Bildung von Vacuolen im Nucleolus besteht nicht.

Die lockeren Chromocentren scheinen sich etwas abgeflacht zu haben und zeigen in ihrem scholligen Bereich distinkte, voneinander getrennte Chromomeren. Die Chromomerenstruktur tritt in den Endochromocentren synchron auf.

Im Endoprophasekern sind demnach zwei Typen von Chromomeren sichtbar: 1. die des Interphasekernes, deren Durchmesser kleiner und deren Abstand voneinander größer geworden sind und 2. die erst jetzt sichtbar gewordenen Chromomeren, die aus dem scholligen Chromatin hervorgegangen sind und deren Durchmesser größer ist als bei den Chromomeren des Interphasekernes. Auffallend ist der geringe Abstand dieser zweiten Chromomeren voneinander. Der Prophasekern erscheint demgemäß feinkörniger (Abb. 1 c, e, g und i). Der DNS-Gehalt der Chromomeren ist ausgeglichener geworden, obwohl auch jetzt noch geringfügige, wahrscheinlich durch die verschiedene Größe bedingte Unterschiede in der FEULGEN-Färbung bestehen. Die Umrißform der Chromomeren variiert von einer mehr oder minder ellipsoidischen bis zur kugeligen Form, sie ist im allgemeinen regelmäßiger als im Interphasekern.

Eine Verkleinerung der Chromomeren wurde auch für *Urtica caudata* (TSCHERMAK-WOESS u. HASITSCHKA 1953) beschrieben. Die Bildung von hantelförmigem Chromomeren, die bei *Sauromatum* von TSCHERMAK-WOESS (1954) als typische prophasische Teilungsstrukturen gedeutet wurden, konnte bei *Pedicularis* vielleicht wegen der Kleinheit der Strukturen nicht festgestellt werden. Somit fehlt bei *Pedicularis* das eine Kriterium, das nach TSCHERMAK-WOESS (1954) die Endo-Prophase

von der Endo-Metaphase trennt. Da auch keine Zerlegung der SAT-Chromocentren in kugelige Chromomeren zu beobachten war, ist auch das zweite Unterscheidungsmerkmal der beiden von TSCHERMAK-WOESS postulierten Phasen nicht vorhanden. Die Hüllsubstanz der SAT-Chromocentren muß also bei *Pedicularis* noch resistenter als sonst sein.

c) Veränderungen im Laufe der Endomitosecyclen. Die Zahl der Chromomeren nimmt wie bei *Curcurbita pepo* (TSCHERMAK-WOESS u. HASITSCHKA 1953) während der Endopolyploidisierung zu, jedoch nicht deren Größe (vgl. Abb. 1). Dies läßt sich bei der Messung der Chromomeren in Interphase- und Prophasekernen verschiedenen Polyploidiegrades feststellen. Die Größenunterschiede im Interphase- (0,6—1,1 μ Durchmesser) und Prophasekern (0,4—0,7 μ) dürften auf Reduplikation im Interphasekern und auf Teilung der Chromomeren in der Prophase beruhen.

Die scholligen Chromocentrenbereiche nehmen während der Endopolyploidisierung an Größe zu (vgl. Abb. 1f, h und k). Der Zusammenhalt der Einzelelemente der Endochromocentren scheint bei höherem Polyploidiegrad nicht abzunehmen, wie es TSCHERMAK-WOESS (1954) für *Sauromatum* angibt. Wahrscheinlich werden in den Interphasekernen der verschiedenen Polyploidiestufen die Abstände der Chromomeren nicht wesentlich geändert, so daß die relativ großen Chromomeren bei erhöhter Zahl zu größeren scholligen Aggregaten verkleben. Dies gilt besonders für die Haustorialkerne. Die Endochromocentren können sich zu Sammelchromocentren vereinigen.

Die Zahl der SAT-Chromocentren wird nicht vermehrt, jedoch ist eine deutliche Substanzzunahme bei steigendem Polyploidiegrad zu beobachten (Abb. 1b, f, h und k). Bei den SAT-Chromocentren handelt es sich um echte Endochromocentren mit Mehrfachstruktur. Dies wird zuweilen deutlich, wenn durch das Nucleolenwachstum eine partielle Trennung der Einzelelemente erfolgt. So konnten mehrfach Doppel- (Abb. 1d, f und g) und seltener Vierfach-Strukturen beobachtet werden.

3. Messungen. Für alle Volumenbestimmungen an Interphasekernen ist es wichtig, daß die Messungen sofort nach Ablauf der Endomitose einsetzen, so daß Sekundärvorgänge ausgeschlossen werden können. Die Streuung der Voluminawerte wird größer sein, wenn mehrere Fruchtknoten für die Auswertung herangezogen werden. Dies ließ sich bei den höheren Polyploidiegraden mit ihrer relativ geringen Anzahl von endomitotischen Teilungsstrukturen nicht umgehen. Bei den niederen Polyploidiestufen wurden die Werte aus mehreren Samenanlagen desselben Fruchtknotens gewonnen.

a) Erste Vergrößerungsphase. Die Tatsache der Zunahme des Kernvolumens vor Beginn der Endomitose ist bekannt, jedoch nicht deren Ausmaß. TSCHERMAK-WOESS u. HASITSCHKA (1953, S. 594) bezeichnen sie ohne Angabe von Werten als „mäßig, aber deutlich". Bei *Pedicularis* ist die Volumenzunahme des diploiden Kernes vom Nucelluskern bis

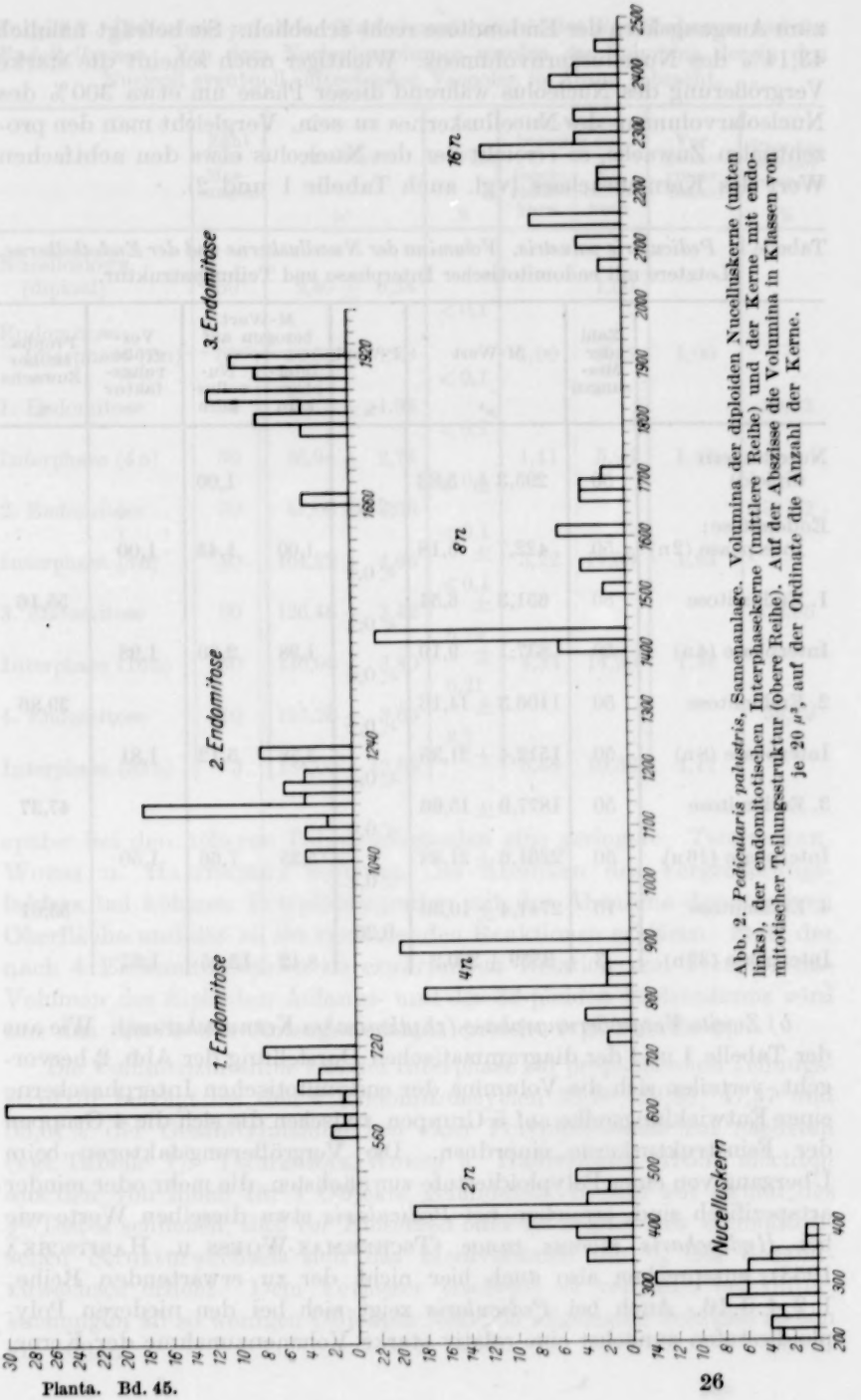


Abb. 2. *Pedicularis palustris*, Samenanlage. Volumina der diploiden Nucelluskerne (unten links), der endomitotischen Interphasekerne (mittlere Reihe) und der Kerne mit endomitotischer Teilungsstruktur (obere Reihe). Auf der Abszisse die Volumina in Klassen von je 20 μ^3, auf der Ordinate die Anzahl der Kerne.

zum Ausgangskern der Endomitose recht erheblich. Sie beträgt nämlich 43,14% des Nucelluskernvolumens. Wichtiger noch scheint die starke Vergrößerung des Nucleolus während dieser Phase um etwa 300% des Nucleolarvolumens des Nucelluskernes zu sein. Vergleicht man den prozentualen Zuwachs, so erreicht der des Nucleolus etwa den achtfachen Wert des Kernzuwachses (vgl. auch Tabelle 1 und 2).

Tabelle 1. *Pedicularis palustris. Volumina der Nucelluskerne und der Endothelkerne.* Letztere mit endomitotischer Interphase und Teilungsstruktur.

	Zahl der Messungen	*M*-Wert μ^3	*P*-Wert %	*M*-Wert bezogen auf Interphasekern	*M*-Wert bezogen auf Nucelluskern	Vergrößerungsfaktor	Prophasischer Zuwachs %
Nucelluskern diploid)	50	295,3 ± 5,83			1,00		
			< 0,1				
Endomitose: Interphase (2n)	50	422,7 ± 5,18		1,00	1,43	1,00	
			< 0,1				
1. Endomitose	50	651,3 ± 6,51					55,16
			< 0,1				
Interphase (4n)	50	837,1 ± 9,19		1,98	2,80	1,98	
			< 0,1				
2. Endomitose	50	1106,3 ± 14,16					39,86
			< 0,1				
Interphase (8n)	50	1512,4 ± 21,35		3,58	5,12	1,81	
			< 0,1				
3. Endomitose	50	1877,9 ± 15,66					47,37
			< 0,1				
Interphase (16n)	50	2261,6 ± 21,38		5,35	7,66	1,50	
			< 0,1				
4. Endomitose	10	2741,4 ± 10,39					55,61
			0,26				
Interphase (32n)	3	3559 ± 200,3		8,42	12,05	1,57	

b) Zweite Vergrößerungsphase (rhythmisches Kernwachstum). Wie aus der Tabelle 1 und der diagrammatischen Darstellung der Abb. 2 hervorgeht, verteilen sich die Volumina der endomitotischen Interphasekerne einer Entwicklungsreihe auf 5 Gruppen, zwischen die sich die 4 Gruppen der Feinstrukturkerne einordnen. Die Vergrößerungsfaktoren beim Übergang von einer Polyploidiestufe zur nächsten, die mehr oder minder artspezifisch sind, erreichen bei *Pedicularis* etwa dieselben Werte wie bei *Hydrocharis morsus ranae* (TSCHERMAK-WOESS u. HASITSCHKA 1953), entsprechen also auch hier nicht der zu erwartenden Reihe: 1:2:4:8:16. Auch bei *Pedicularis* zeigt sich bei den niederen Polyploidiestufen zunächst eine relativ starke Volumenzunahme der Kerne,

Tabelle 2. *Pedicularis palustris. Nucleolusvolumina in den Nucelluskernen und den Endothelkernen.* Von dem Nucleolusvolumen wurden die Volumina der in den Nucleoli eventuell auftretenden Vacuolen in Abzug gebracht.

	Zahl der Messungen	M-Wert μ^3	P-Wert %	M-Wert bezogen auf Interphasekern	M-Wert bezogen auf Nucelluskern	Vergrößerungsfaktor	Prophasischer Zuwachs %
Nucelluskern (diploid)	50	9,40 ± 0,38			1,00		
			< 0,1				
Endomitose: Interphase (2n)	50	32,38 ± 1,83		1,00	3,45	1,00	
			< 0,1				
1. Endomitose	50	45,73 ± 1,94					50,33
			< 0,1				
Interphase (4n)	50	56,94 ± 2,74		1,41	5,95	1,41	
			< 0,1				
2. Endomitose	50	81,06 ± 3,58					51,02
			< 0,1				
Interphase (8n)	50	104,22 ± 4,66		3,22	11,09	1,83	
			< 0,1				
3. Endomitose	50	126,48 ± 3,42					50,95
			0,79				
Interphase (16n)	50	140,06 ± 3,80		4,33	14,90	1,36	
			0,21				
4. Endomitose	10	157,28 ± 3,65					39,19
			8,7				
Interphase (32n)	3	184,00 ± 13,68		5,68	19,58	1,17	

später bei den höheren Polyploidiegraden eine geringere. Tschermak-Woess u. Hasitschka möchten das Absinken des Vergrößerungsfaktors bei höheren Polyploidiegraden mit der Abnahme der relativen Oberfläche und der an ihr verlaufenden Reaktionen erklären. Statt der nach 4 Endomitosecyclen zu erwartenden Relation von 1:16 für das Volumen des diploiden Anfangs- und des 32-ploiden Endstadiums wird nur das 8fache des Anfangsstadiums erreicht (vgl. Tabelle 1).

Die Volumenzunahme von der Interphase zur prophasischen Teilungsstruktur beträgt bei den 4 Endomitosecyclen 55,16; 39,86; 47,37 und 55,61% der Gesamtzunahme von einer Polyploidiestufe zur nächsten (vgl. Tabelle 1). Tschermak-Woess u. Hasitschka (1953) möchten aus den von ihnen für 4 Objekte gefundenen Werten auf Grund des χ^2-Testes schließen, daß vor Einsetzen oder zu Beginn des endomitotischen Strukturwechsels sich das Kernvolumen um $^1/_3$ des Gesamtzuwachses erhöht. Dem Verfasser erscheint es verfrüht, bei Untersuchungen an so wenigen Objekten schon so allgemeine Schlüsse ziehen zu wollen.

Mit steigendem Polyploidiegrad steigt nicht nur das Kernvolumen, sondern auch das Volumen der Nucleoli an. Ein Vergleich der Tabellen 1 und 2 zeigt, daß die Differenzen der Kernvolumina sehr gut (in einem Falle gut) gesichert sind, während die Differenzen für die Volumina der Nucleoli bis zur 4. Endomitose sehr gut bis genügend gesichert sind. Die Differenz zwischen dem Nucleolarvolumen der vierten Endomitose und dem 32-ploiden Kern ist nicht signifikant. Vergleicht man Vergrößerungsfaktor und Volumenzunahme von Kernen und Nucleoli (vgl. Tabelle 1 und 2), soweit diese Werte gesichert sind, so findet man zwar ein stetes gleichsinniges Ansteigen des Nucleolarvolumens, jedoch keine absolute Übereinstimmung mit dem Zuwachs des Kernvolumens. Auch bei den Nucleoli ist eine Volumenzunahme vom Interphasekern zur Endoprophase um etwa 50% des Gesamtzuwachses von einer Polyploidiestufe zur nächsten zu beobachten (50,33, 51,02 und 50,95% des Gesamtzuwachses eines Endomitosecyclus). Diese Tatsache ist von Bedeutung, da sie einen Unterschied zum Verhalten des Nucleolus bei der normalen Mitose darstellt.

Diskussion.

Das Vorkommen der Endomitose im Endothel der Samenanlage konnte hier erstmalig nachgewiesen werden. Besonders interessant ist das Vorkommen in diesem Gewebe, das gern in seiner physiologischen Leistung mit dem Antherentapetum verglichen wird. Für das einkernige Antherentapetum konnte CARNIEL (1952, 1954) Endomitose wahrscheinlich machen.

Die bei *Pedicularis palustris* im Endothel mit diploider und in Teilen des Endosperm mit triploider Ausgangszahl ablaufende Endomitose ist als maskierte Endomitose aufzufassen. Sie zeigt einen geringeren endomitotischen Strukturwechsel als bei *Sauromatum* (TSCHERMAK-WOESS 1954). Es wird angenommen, daß die scholligen Chromocentrenbereiche durch Verklebung von Chromomeren entstanden sind. Dies wird aus dem Auftreten zusätzlicher scholliger Bezirke in den Haustoriumkernen und aus dem Fehlen von Korrosionsstadien geschlossen. Die zweite Alternative, daß in diesem Bereich noch Hüllsubstanz vorhanden ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Bei der ersten Annahme würde die Feinstruktur bereits durch die Vergrößerung der Abstände zwischen den Chromomeren erreicht, bei der zweiten müßte in der Endoprophase ein Abbau der Hüllsubstanz erfolgen.

Die Chromatinvermehrung erfolgt im Interphasekern. Dies würde mit den Befunden von GRUNDMANN u. MARQUARDT (1953) übereinstimmen, die bei der normalen Mitose von *Vicia faba* die DNS-Verdoppelung in der Interphase beobachten konnten. Bei *Pedicularis* ist die

Chromatinvermehrung cytologisch an der Vergrößerung der scholligen Chromocentrenbereiche und der freien Chromomeren sichtbar.

Die Strukturanalyse des diploiden Ausgangskernes für die Endomitosecyclen ergibt eine Zunahme des Chromatins gegenüber dem Nucelluskern. Demgemäß würde in der prä-endomitotischen Vergrößerungsphase die für die erste Endomitose notwendige Chromatinvermehrung erfolgen, und in dem folgenden Prophasestadium wahrscheinlich eine hier nicht nachweisbare Teilung der vermehrten Chromomerensubstanz stattfinden. Die prä-endomitotische Vergrößerungsphase wäre also als notwendige Vorbereitungsphase in das rhythmische Kernwachstum einzubeziehen. Welche Faktoren darüber entscheiden, ob nach der Chromatinvermehrung eine normale Mitose oder eine Endomitose abläuft, ist unbekannt. Vielleicht ergeben Objekte, in deren Gewebe Mitosen mit Endomitosen vikariieren, neue Einblicke.

Die Chromatinzunahme in steigenden Polyploidiestufen ist durch Vermehrung der Chromomerenzahl, Vergrößerung der scholligen Chromocentrenteile und der SAT-Chromocentren gekennzeichnet. Zusammen mit der Volumenzunahme von Kern und Nucleolus ergeben sie Anhaltspunkte für die Schätzung des Polyploidiegrades, wenn für die statistische Sicherung ausreichendes Material nicht erreichbar ist. Dabei dürfen nicht ohne weiteres Vergleiche mit Endomitosen in anderen Geweben gezogen werden, da die Größe des Ausgangskernes und damit der später erreichten Polyploidiestufen unterschiedlich sein kann. Nach den Untersuchungen von Tschermak-Woess u. Hasitschka (1954) soll der Vergrößerungsfaktor jedoch bei Endomitosen in verschiedenen Geweben wenig verändert sein, so daß der in einem Gewebe ermittelte artspezifische Vergrößerungsfaktor übertragbar erscheint.

Wie aus den Tabellen 1 und 2 hervorgeht, ist es für die Bestimmung des Vergrößerungsfaktors wichtig, den Ausgangspunkt für die Berechnung festzulegen. Wird der prä-endomitotische Nucelluskern statt des sonst üblichen diploiden endomitotischen Interphasekernes als Ausgangsgröße genommen, so verändert sich der Vergrößerungsfaktor für die Stufe: Diploidie zu Tetraploidie von 1,98 auf 2,80.

Der Vergleich zwischen der Volumenzunahme von Kern und Nucleolus zeigt ein gleichsinniges Ansteigen der Volumina, wenn auch die Vergrößerungsfaktoren nicht absolut übereinstimmen. Damit ist die von anderen Autoren (Tschermak-Woess u. Hasitchka 1953, S. 86, 93, 99 und Resch 1952, S. 311) vermutete Vermehrung der Nucleolensubstanz bei Endopolyploidie nunmehr bewiesen. Wenn man die bekannte Beziehung zwischen Nucleolenkondensation und SAT-Zonen auf die endopolyploiden Stadien anwendet, müßte mit der Verdoppelung der nucleolenkondensierenden Abschnitte auch die Potenz zur Nucleoluskondensation verdoppelt werden. Da die nucleoluskondensierenden

Zonen, wie aus der Lage der SAT-Chromocentren geschlossen werden darf, vereinigt bleiben und ihre Lage zum Nucleolus nicht verändern, wird die neu kondensierte Substanz nicht in gesonderten Nucleolen entstehen, sondern nur zur Vergrößerung des vorhandenen Nucleolus führen.

Wie weit die Potenz zur vermehrten Kondensation von Nucleolensubstanz realisiert wird, dürfte von physiologischen Faktoren abhängen. Man wird die Vermehrung der Nucleolensubstanz also nur mit Vorbehalt als eine der die Endomitose charakterisierenden Fakten anführen, die aber in ihrer Gesamtheit ein verläßliches Kriterium für den Ablauf von Endomitosen darstellen.

Ob die starke Vermehrung der Nucleolensubstanz in der ersten Vergrößerungsphase (vgl. Tabelle 2) allgemein vorkommt, und ob sie für diese Phase und damit die Einleitung der Endomitose charakteristisch ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Es wären drei Vorstellungen möglich: entweder ist nur in dieser Phase eine so starke Nucleolusvergrößerung möglich und die so bedingte Verschiebung der Kern- und Nucleolusanteile ein Anlaß oder auch nur ein Symptom für die einsetzende Endomitose. Oder die Potenz zur vermehrten Bildung von Nucleolussubstanz wird in den späteren Endomitosecyclen nicht mehr voll ausgenutzt, so daß ein Absinken des Vergrößerungsfaktors erfolgt. Oder es überlagern sich zwei Prozesse, deren gemeinsames Erscheinungsbild uns in der präendomitotischen Struktur- und Größenänderung vor Augen tritt. Auf jeden Fall ist die Vermehrung der Nucleolensubstanz neben der Chromatinvermehrung einer der Faktoren, die zur Kernvergrößerung führen. Ein Charakteristikum der Endoprophase scheint es zu sein, daß nicht wie bei der mitotischen Prophase ein Abbau des Nucleolus einsetzt, sondern seine Substanz vermehrt wird.

Die exzessive Cytoplasmavermehrung in endopolyploiden Zellen ließe sich mit dem CASPERSSON-Schema durch Vermehrung der Nucleolensubstanz und der RNS in dieser erklären. Solange jedoch nur die Größenzunahme des Nucleolus und nicht der quantitative Anteil von Histoneiweißen, Phospholipoiden und RNS bei dieser Vergrößerung bekannt sind, ist noch kein sicherer Ausgangspunkt für die CASPERSSONsche Vorstellung gegeben.

Zusammenfassung.

In den Samenanlagen von *Pedicularis palustris* laufen zwei Endomitosereihen ab. Die eine nimmt ihren Ausgangspunkt vom diploiden Nucellusgewebe und erreicht im Endothel maximal 32-Ploidie und in den angrenzenden Zellen der Samenanlage Oktoploidie. Die zweite Reihe geht vom triploiden Endosperm aus und erreicht im mikropylaren Bereich Hexaploidie und im chalazalen Dodekaploidie. Der Polyploidie-

grad in den Kernen des mikropylaren Haustoriums wird auf 192—384-Ploidie geschätzt. Beide Reihen lassen sich an der Zahl der SAT-Chromocentren unterscheiden: 4 im Gewebe der Samenanlage und 6 im Endosperm.

Der Nachweis der Endomitose wird durch die Beobachtung der rhythmischen Wiederkehr von endomitotischen Teilungsstrukturen, der Chromatinvermehrung und des rhythmischen Wachstums des Kernes erbracht. In den endomitotischen Interphasekernen lassen sich zwei Chromocentren unterscheiden, die sich in verschiedenem Maße am endomitotischen Strukturwechsel beteiligen. In den SAT-Chromocentren erfolgt keine sichtbare Änderung, in den scholligen Bereichen der lockeren Chromocentren tritt in der Endoprophase Chromomerenstruktur auf. Die endomitotische Teilungsstruktur unterscheidet sich von der Interphase: 1. durch Vergrößerung der Abstände zwischen den Chromomeren, 2. durch Verringerung des Durchmessers der Chromomeren und 3. durch das Auftreten von größeren Chromomeren im scholligen Heterochromatin.

Die Polyploidiestufen unterscheiden sich voneinander durch die Größe der SAT-Chromocentren und der scholligen Chromocentrenbereiche und die Zahl der sichtbaren Chromomeren, jedoch nicht durch die Chromomerengröße.

In der prä-endomitotischen Vergrößerungsphase erfolgt eine Chromatinzunahme und vor allem eine Vermehrung der Nucleolensubstanz (um etwa 300%). Diese erste Vergrößerungsphase führt zum endomitosebereiten, diploiden Ausgangskern der Endomitose.

Während des die Endomitose charakterisierenden rhythmischen Kernwachstums findet parallel mit dem Kernwachstum eine Vergrößerung der Nucleolen statt. Die Vergrößerungsfaktoren stimmen jedoch nicht völlig überein. Die Endoprophase ist durch Zunahme an Nucleolensubstanz charakterisiert. Die Potenz zur Vermehrung der Nucleolensubstanz dürfte durch die in der Endomitose erfolgte Vermehrung der nucleoluskondensierenden Zonen gegeben sein.

Literatur.

Berg, R. Y.: Development and dispersal of the seed of Pedicularis silvatica. Nytt Mag. Bot. **2**, 1—60 (1954). — Carniel, K.: Das Verhalten der Kerne im Tapetum der Angiospermen mit besonderer Berücksichtigung von Endomitosen und sogenannten Endomitosen. Österr. bot. Z. **99**, 318—362 (1952). — Endomitosen im zellulär-einkernigen Tapetum. Österr. bot. Z. **101**, 434—435 (1954). — Cretté, P.: Embryologie des Scrofulariacées. Développement de l'albumen et de l'embryon chez le Teedia lucida (Soland). Rud. Bull. Soc. bot. France **99**, 266—268 (1952). — D'Amato, F.: Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. A critical examination of the literature. Caryologia (Pisa) **4**, 311—358 (1952). — Geitler, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. In Protoplasmatologia, Bd. VI, c. Wien: Springer 1953. — Grundmann, E., u. H. Marquardt: Untersuchungen an Interphasekernen des Wurzelmeristems von

Vicia faba. 1. Mitteilung. Desoxyribosenukleinsäure-Gehalt und Größe der Kerne. Chromosoma **6**, 115—134 (1953). — KUCKUCK, H., u. A. MUDRA: Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenzüchtung. Stuttgart: S. Hirzel 1950. — RESCH, A.: Untersuchungen über Kerndifferenzierung in peripheren Zellschichten der Sproßachse einiger Blütenpflanzen. Chromosoma **5**, 296—316 (1952). — ROSÉN, W.: Beiträge zur Kenntnis der Embryologie der Goodeniaceen. Acta Horti Gotoburg **12**, 1—10 (1937). — Notes on the embryology of Globularia vulgaris. Bot. Not. (Lund) **1940**, 253—261. — SCHMID, E.: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Scrophulariaceae. Beih. bot. Cbl., 1. Abt. **20**, 175—299 (1906). — SCHRADER, F., and C. LEUCHTENBERGER: A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in Arvelius albopunctatus (DE GEER). Exper. Cell Res. **1**, 421—452 (1950). — STEFFEN, K.: Cytological observations on endosperm haustories. Rapports et communications. Section 8 a Morph. embr. 8. Congrès internat. de Botanique Paris 1954. — TSCHERMAK-WOESS, E.: Beobachtungen zur karyologischen Anatomie von Sauromatum guttatum. Planta (Berl.) **44**, 509—531 (1954). — TSCHERMAK-WOESS, E., u. G. HASITSCHKA: Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose, rhythmisches Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen. Chromosoma **5**, 574—614 (1953). — Über die endomitotische Polyploidisierung im Zuge der Differenzierung von Trichomen und Trichocyten. Österr. bot. Z. **101**, 79—117 (1954).

Prof. Dr. K. STEFFEN, (16) Marburg a. d. Lahn,
Botanisches Institut, Pilgrimstein 4.

Planta, Bd. 45, S. 395—404 (1955).

Aus dem Botanischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn.

LICHT- UND ELEKTRONENOPTISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN FEINBAU DES CHROMATOPHORS VON *ANKISTRODESMUS BRAUNII* (NÄGELI) BRUNNTHALER.

Von

KURT STEFFEN und FRIEDRICH WALTER.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. März 1955.)

Submikroskopische Studien an Algen, die für stoffwechselpysiologische Untersuchungen Verwendung finden, sind in gleicher Weise für den Cytomorphologen und den Physiologen von Bedeutung. Die Struktur des Algenchromatophors ist auch von phylogenetischem Interesse, zumal in letzter Zeit der Versuch unternommen wurde, das Algenchromatophor mit einem Chloroplastengranum der höheren Pflanzen zu homologisieren.

Aus den laufenden Untersuchungen wird an dieser Stelle über die Feinstruktur des Chromatophors von *Ankistrodesmus braunii* berichtet, das durch das regelmäßige Auftreten einer bisher in dieser Form nicht beobachteten Maschenstruktur auffällig ist. Zugleich werden die wenig kritischen submikroskopischen Untersuchungen von SPONSLER u. BATH (1949) berichtigt.

A. Methodik.

Für die lichtoptischen Untersuchungen wurde das Ortholux-Mikroskop von Leitz mit Phasenkontrast- und Fluorescenzeinrichtung benutzt. Zur Verwendung kamen bei der Hellfeldmikroskopie der Leitz-Apochromat 2 mm 90:1, n. A. 1,32 und der Zweiblenden-Hellfeldkondensor nach BEREK, bei der Phasenkontrastuntersuchung das Objektiv Leitz 1/10 Fl 70:1, n. A. 1,15 und der Phasenkontrastkondensor nach HEINE (GOTTSCHEWSKI 1953). Für die Analyse des Chromatophors wurde das sehr kontrastreiche Hellfeld 2 des Heine-Kondensors in Verbindung mit gekreuzten Polarisationsfiltern verwendet. Als Lichtquelle für das bei dieser Kombination sonst zu lichtschwache Bild und für die fluorescenzoptischen Untersuchungen diente die Philips-Quecksilberhöchstdrucklampe CS 150 der LEITZschen Fluorescenzeinrichtung. Die Fluorescenzuntersuchungen erfolgten im Blaulicht (Erregerfilter BG 12/4 mm, Durchlässigkeit 390—440 mμ; Okularsperrfilter OG 1/2,5 mm). Für die Mikroaufnahmen im Hellfeld und bei Kombination des Hellfeldes 2 mit gekreuzten Polarisationsfiltern wurde ein strenges Grünfilter (λ = 547 mμ) mit geringer Bandbreite (110 Å) verwendet. Die Aufnahmen wurden mit der Leica in Verbindung mit der Aufsatzkamera Mikas auf ADOX KB 14 und Agfacolor Umkehrfilm für Kunstlicht hergestellt. Die Fixierung der Algen für die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte bei 0—2° C in Veronal/Acetat-gepufferter 1% Osmiumsäure bei einem p_H-Wert von 7,2 (PALADE 1952) unter Zusatz von Saccharose. Die Algen wurden bei gleicher Temperatur entwässert

und in entstabilisiertes Methacrylatgemisch (Methyl-Butylmethacrylat 2:8) überführt. Die Polymerisation des Monomerengemisches wurde unter Zugabe von 1% Polymerisationskatalysator (Dichlorbenzoylperoxyd) bei 47° C im Thermostaten oder nach einer an anderer Stelle ausführlich zu beschreibenden Kaltpolymerisationsmethode durchgeführt. Die Dünnstschnitte von etwa 300—500 Å Dicke wurden mit einem von dem zweiten Verfasser modifizierten Minot-Mikrotom von Leitz hergestellt. Der Objektvorschub erfolgt dabei durch thermische Ausdehnung. Als Messer dienten Glasmesser, die aus oberflächenpoliertem VDS-Spiegelglas nach bestimmter Methode gebrochen wurden. Die Schnitte wurden auf mit Formvarfolien belegte Platinblenden aufgezogen und ohne Herauslösen des Einbettungsmittels im Siemens-Übermikroskop (ÜM 100b) bei 80 KV Strahlspannung betrachtet. Die Aufnahmen erfolgten meist bei 5700facher Vergrößerung auf Kranz-Repro-Platten[1].

B. Eigene Untersuchungen

1. Lichtoptische Untersuchungen. Die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an 10—14 Tage alten Normalkulturen (Nitrat-Nährlosung) von *Ankistrodesmus braunii* (NÄGELI) BRUNNTHALER ausgeführt. In den Kulturen treten in wechselndem Verhältnis schmale langgestreckte und kurze gedrungene Zellen mit größerem Durchmesser auf. Inwieweit diese Zellform mit den von TAMIYA und Mitarbeitern (1954) beschriebenen Hell- und Dunkelformen von *Chlorella* vergleichbar sind, wäre noch zu prüfen. Die Grobstruktur des Algenchromatophors ist bereits durch die Untersuchungen von OETTLI (1927) bekannt. Das Chromatophor hat im entrollt gedachten Zustand etwa Ellipsenform mit unregelmäßigem Umriß. Räumlich betrachtet stellt es eine bikonvexe Linse dar, deren Ränder in verschiedenem Maße nach innen eingeschlagen sind und zwischen sich einen von Cytoplasma und Kern erfüllten Hohlraum lassen. Da die Chromatophorränder eingeschnitten sein können, kann der Umrollungsgrad in verschiedenen Ebenen unterschiedlich sein (vgl. auch Abb. 2). Unregelmäßigkeiten bei der Einrollung der Ränder treten auch bei Torsion des Chromatophors auf.

Bei der Untersuchung im Hellfeld 2 mit gekreuzten Polarisationsfiltern und Verwendung einer starken Lichtquelle (Quecksilberhöchstdrucklampe) wird im Chromatophor eine netzartige Struktur sichtbar (Abb. 1a). Messungen am vergrößerten Mikrophoto ergaben hier eine Netzmaschenweite in der Größenordnung von 0,5 μ. Daß es sich hier um eine echte Feinstruktur und nicht um ein optisches Artefakt handelt, läßt sich durch Beobachtung im reinen Zernike-Phasenkontrast,

[1] Die Verff. danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die das Übermikroskop der Universität Marburg zur Verfügung stellte, Herrn Prof. Dr. HERZBERG für die Erlaubnis, das Gerät benutzen zu dürfen, den Opt. Werken E. LEITZ, Wetzlar, die dem zweiten Verf. in ihrem Mikrolabor die erforderlichen Geräte und einen Arbeitsplatz zur Verfügung stellten, und den Herren Doktoren KLEINSCHMIDT und VOGELL für Ratschläge bei der Benutzung des Übermikroskopes.

im Hellfeld 2 und im normalen Hellfeld nachweisen. Auch bei diesen Beobachtungsarten ist die Maschenstruktur, wenn auch weniger deutlich, sichtbar. Daß die Feinstruktur durch chlorophyllhaltige Substanz bedingt ist, zeigt die Fluorescenzanalyse. Innerhalb des Chromato-

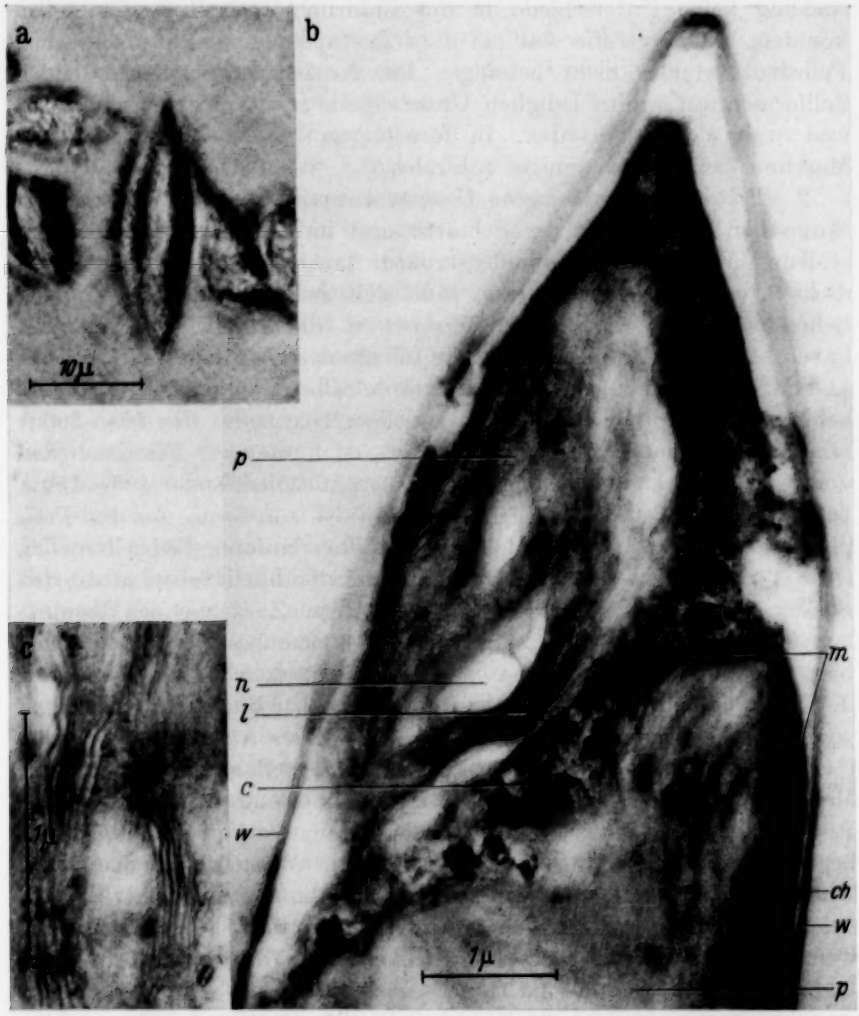


Abb. 1 a—c. *Ankistrodesmus braunii*. a Lebende Zellen in Kulturlösung. Aufnahme im Hellfeld 2 bei gekreuzten Polarisationsfiltern. b Längsgeschnittene Spitze einer jungen Zelle (Typ der langgestreckten Zellform). Die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde bei 5700facher Vergrößerung hergestellt und nachvergrößert. Zeichenerklärung: *w* 3schichtige Zellwand, *p* Chromatophor, *ch* Chondriosom im Querschnitt, *m* Chromatophorenmembran, *n* angeschnittene Netzmasche im Chromatophor, *l* Doppellamelle und *c* Cytoplasma. c Doppellamellen-Struktur. Teilausschnitt aus einem Längsschnitt durch das Chromatophor. Originalvergrößerung 11400fach, nachvergrößert.

phornetzes sind keine Orte stärkerer Fluorescenz sichtbar, die etwa auf Konzentration des Chlorophylls schließen ließen. Diese Beobachtung ist wichtig, da SPONSLER u. BATH (1949) bei *Ankistrodesmus falcatus* das Vorkommen von Grana auf Grund ihrer submikroskopischen Untersuchungen für möglich halten, obwohl auch sie bei lichtoptischer Untersuchung keine Unterschiede in der Chlorophyllverteilung feststellen konnten. Reservestoffe sind an dem Zustandekommen des optischen Feinstrukturbildes nicht beteiligt. Die Netzstruktur tritt in beiden Zellformen auf, wobei lediglich Unterschiede in der Netzmaschenform und -weite deutlich werden. In den jungen schmalen Zellen sind die Maschen kleiner und weniger zahlreich.

2. *Elektronenmikroskopische Untersuchungen.* Bei elektronenmikroskopischer Betrachtung der Schnitte sind im Chromatophor die Plastidenmembran und die Lamellenstruktur nachweisbar. Die 200—300 Å dicke Chromatophorenmembran läßt sich nur an günstig geführten Schnitten erkennen, wie schon WOLKEN u. PALADE (1953) festgestellt haben. Im vorliegenden Fall ist sie infolge des komplizierten Umrisses und der räumliche Form des Chromatophors besonders schwer zu beobachten. Das Grundelement der Lamellenstruktur ist die 280—300 Å breite Doppellamelle (Abb. 1 c). Sie setzt sich aus zwei Einzellamellen von je 80 Å Dicke zusammen, deren Abstand voneinander 100—150 Å beträgt. Der Abstand der Einzellamellen ist konstant. An der Peripherie des Chromatophors sind 6—10 parallel verlaufende Doppellamellen (Abb. 1 b u. 3) zu beobachten, wobei der Interlamellarabstand an den Stellen engster Lagerung etwa 300 Å beträgt. Zwischen den Doppellamellen sind zuweilen granuläre Strukturen unbekannter Natur sichtbar. Im Inneren des Chromatophors tritt durch Auseinanderweichen der Doppellamellen ein Maschensystem auf (Abb. 1 b u. 3). Die Maschen werden je nach ihrer Größe und der Dichte ihres Auftretens von zwei (bei kleinen Maschen) oder fünf bis neun Doppellamellen (bei großen Maschen) begrenzt. Die Hohlräume stellen im Idealfall ein dreiachsiges Rotationsellipsoid dar. Die Netzmaschenweite variiert von 0,3—1 μ, liegt also im lichtmikroskopischen Bereich. Wie ein Vergleich der Abb. 1 b und 3 zeigt, sind die Netzmaschen im Chromatophor der erwachsenen Zellform wesentlich größer. Die Meßwerte für die Maschenweite stimmen im licht- und elektronenoptischen Bild größenordnungsmäßig überein. Damit sind Existenz der Maschen und Raumnetzstruktur des Chromatophors erwiesen. Die Maschen sind nicht von der Plastidenmembran ausgekleidet. Das Raumnetz des *Ankistrodesmus*-Chromatophors ist also eine Binnenstruktur und steht damit im Gegensatz zu netzförmig durchbrochenen Algenplastiden. Phylogenetische Beziehungen zwischen beiden Strukturen herstellen zu wollen, erscheint unberechtigt.

Die beschriebene Raumnetzstruktur wird als kontinuierliche Plastidenstruktur bei der Teilung an die Tochterorganismen weitergegeben, wie die licht- und elektronenoptische Untersuchung von Teilungsstadien zeigte.

Über Stärkebildung und das Vorkommen von Reservestoffen wird an anderer Stelle berichtet werden.

Beschreibung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen:

Die beschriebene Chromatophorstruktur wird durch die Abbildung 1b und 3 belegt. Auf dem elektronenoptischen Bild des Längsschnittes durch eine kleine, langgestreckte Zellform (Abb. 1b) hat sich das Cytoplasma durch die Fixierung bedingt von der Zellwand (*w*) gelöst. Dies wird besonders an der Zellspitze deutlich. Im unteren Bildteil ist die Zellwand (*w*) exakt längs geschnitten und zeigt im Gegensatz zu den auf lichtoptische Untersuchungen gestützten Angaben von West u. Fritsch (1927) eine 3-Lamellen-Struktur. Im oberen Bildteil sieht man auf die zum Teil umgekippte Fläche der schräg angeschnittenen Zellwand. Das Chromatophor (*p*) ist durch den Schnitt in zwei Teile zerlegt. Zwischen beiden Teilen verläuft von rechts oben nach links unten ein Cytoplasmastrang (*c*). Im unteren Bildteil ist ein Flächenschnitt durch das Chromatophor, im oberen Teil ein Querschnitt sichtbar. Die Rekonstruktionsskizze (Abb. 2) zeigt, daß der untere lamellenparallele Schnitt in der Ebene der letzten gegen das Cytoplasma grenzenden Doppellamelle geführt ist. Am rechten Bildrand des unteren Schnittes werden quergeschnittene Doppellamellen (*l*) sichtbar, da dieser Rand nach innen (vom Beschauer weg) umgebogen ist. Die Chromatophorspitze ist vom Beschauer weg eingerollt (vgl. Abb. 2). Sie ist deswegen im Schnitt zweimal quer getroffen, wobei in beiden Fällen die Doppellamellen zu sehen sind. Der Querschnitt durch die Chromatophorspitze geht nach unten allmählich in den lamellenparallelen Flächenschnitt über. Die Maschenstruktur (*n*) ist nur im oberen Querschnitt der

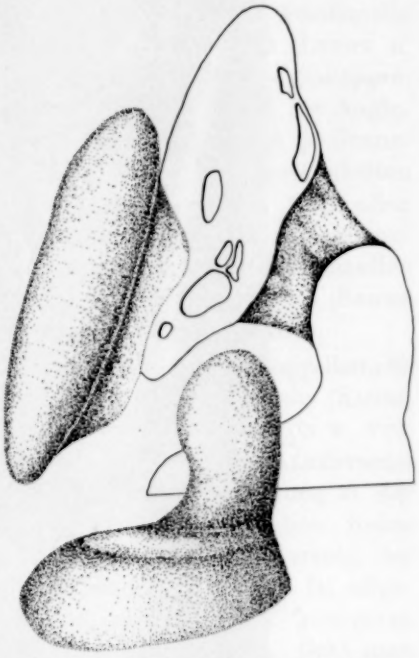


Abb. 2. *Ankistrodesmus braunii*. Rekonstruktionsskizze zum Längsschnitt der Abbildung 1b. Punktiert dargestellt sind die ergänzten Chromatophorteile.

Plastidenspitze sichtbar, die Chromatophorenmembran (*m*) nur im unteren Bildteil.

Die Netzmaschen (*n*) der Abb. 1b sind kleiner und in geringerer Zahl vorhanden als im Längsschnitt durch das Chromatophor der er-

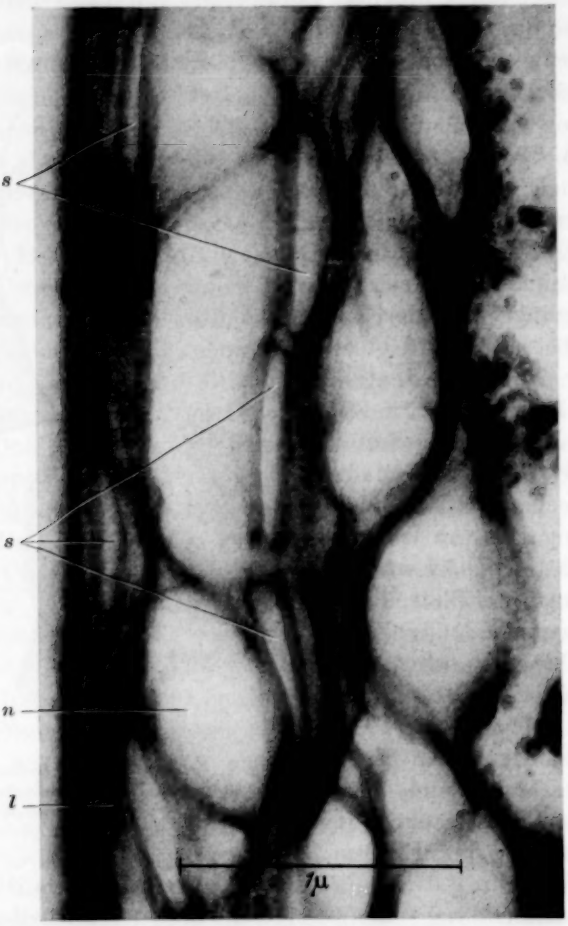


Abb. 3. *Ankistrodesmus braunii*. Längsschnitt durch das Chromatophor einer erwachsenen Zelle (Typ der langgestreckten Zellform). Ausschnitt aus einer bei 11400facher Vergrößerung hergestellten elektronenmikroskopischen Originalaufnahme. Zeichenerklärung: *n* angeschnittene Maschen im Chromatophor, *l* Doppellamellen und *s* Stärke.

wachsenen Zelle (Abb. 3). Stärke„vakuolen" (*s*) unterschiedlicher Größe sind im linken (Beginn der Stärkebildung) und im rechten Bildteil (größere Stärkekörner) zu erkennen. Die Stärkekörner sind zwischen zwei Doppellamellen (*l*) entstanden (besonders deutlich im linken, oberen Bildteil). Zum Teil sind die begrenzenden Doppellamellen umgekippt oder schräg angeschnitten. Die Doppellamellenstruktur wird auf der

Abb. 1c demonstriert, die einen Ausschnitt aus einem längsgeschnittenen Chromatophor darstellt.

C. Diskussion.

Voraussetzung für einen Vergleich von Meßwerten ist, daß diese mit gleicher Technik gewonnen wurden. Soweit man aus den bisher bekanntgewordenen Meßergebnissen bei Algen schließen darf, scheint die Dicke der Feinlamellen (= membranes oder membranes of the disk der angelsächsischen Literatur) einheitlich zu sein. Die Dicke der Feinlamelle beträgt bei *Ankistrodesmus* etwa 80 Å, bei *Fucus* 60 ± 20 (LEYON u. VON WETTSTEIN 1954), bei *Cladophora*, *Enteromorpha*, *Spirogyra*, *Mougeotia* und *Closterium* 80 ± 20 (LEYON 1954a) und bei der Angiosperme *Aspidistra* z. B. 60—80 Å (LEYON 1954b oder 65 Å je Granalamelle STEINMANN und SJÖSTRAND 1955). Wer die Schwierigkeiten der Größenbestimmung im Elektronenmikroskop kennt, wird allen Meßwerten eine gewisse Toleranz zubilligen und darum die scheinbar aus dem Rahmen fallenden Angaben von 50 Å dicken Feinlamellen bei *Chlorella* (ALBERTSSON u. LEYON 1954) und *Chlamydomonas* (SAGER u. PALADE 1954) noch derselben Größenkategorie unterordnen.

Diese Feinlamellen wurden bisher meist paarweise als Doppellamelle (dense lamella) z. B. bei *Ankistrodesmus* und *Chlamydomonas* (SAGER u. PALADE 1954) oder als Vierer-Aggregat bei *Fucus* (LEYON u. VON WETTSTEIN 1954 und VON WETTSTEIN 1954) und *Chlorella* (ALBERTSSON u. LEYON 1954) beobachtet. Soweit dürfte Übereinstimmung in der Deutung und Bewertung der beobachteten Strukturen bestehen. Keine Einigkeit scheint jedoch nach GRANICK (1955) in der Bewertung der Zwischenräume zwischen den Einzellamellen zu herrschen. Im allgemeinen werden die benachbarten Einzellamellen mit dem geringsten Zwischenabstand (interspace) als Struktureinheit gewertet. Geht man jedoch von der Vorstellung aus, die Doppellamellen seien nur die Begrenzungslinien einer mehr oder minder dicken Scheibe (disk), so lassen sich auch Einzellamellen mit größerem Abstand zu einer Struktureinheit zusammenfassen. Nach unserer Ansicht gibt es folgende Kriterien für die Struktureinheit: 1. der schwierig zu führende direkte Nachweis, daß die Einzellamellen einer Einheit an der Peripherie miteinander verbunden sind, die Einzellamelle also ein Kontinuum ist (z. B. bei *Chlamydomonas* nach SAGER u. PALADE 1954), 2. der Indizienbeweis, daß der Abstand der beiden als Struktureinheit gewerteten Einzellamellen gleichbleibt, während die Abstände zwischen den Doppellamellen variieren (z. B. bei *Ankistrodesmus*) und 3. wahrscheinlich der Ort der Stärkebildung (zwischen den Doppellamellen). Vergleicht man die mit den beiden ersten Kriterien gewonnenen Meßwerte der doppelkonturierten Struktureinheit (*Chlamydomonas* 340 Å [SAGER u. PALADE

1954], *Chlorella* 350 Å [ALBERTSSON u. LEYON 1954] und *Ankistrodesmus* 280—300 Å), so stimmen die Werte mit einer geringen Streuung gut überein. Auffallend ist, daß auch die Durchmesser der Vierer-Aggregate (Chromatophoren von *Fucus:* Vegetationspunkt 280 ± 70, Rindenzellen 280 ± 90 und Eizelle 370 ± 80 Å [LEYON u. VON WETTSTEIN 1954]) sich im selben Rahmen bewegen, demnach müßten die Abstände der Einzellamellen voneinander (interspaces) im Zweier- und Vierer-Aggregat (Meßwerte liegen bei *Fucus* und *Chlorella* nicht vor) und die Masse der Zwischensubstanz unterschiedlich sein. Wenn aber die Masse der Zwischensubstanz (also der Inhalt der von den Einzellamellen konturierten Scheibe) variabel sein kann, so wäre es auch grundsätzlich denkbar, daß durch andere Deutung benachbarter Feinlamellen Struktureinheiten von größerem Durchmesser entstehen. Diese Möglichkeit muß man in zweifelhaften Fällen offen lassen. Diese Variabilität in der Masse der Zwischensubstanz dürfte einige Konsequenzen für die Bewertung dieser Substanz und die Lokalisation von Stoffen in ihr haben.

Die bei *Ankistrodesmus* beobachtete Chromatophorenmembran von 200—300 Å Dicke ist, selbst wenn man den Meßwert von 200 Å als den vermutlich exakten Querschnitt zugrunde legt, noch recht dick im Verhältnis zu der bei *Chlamydomonas* beobachteten Membran von 100 Å (SAGER u. PALADE 1954). Daß die Membran des Algenchromatophors keine Cytoplasmagrenzlamelle ist, dürfte aus den Untersuchungen an *Chlamydomonas* (SAGER u. PALADE 1954) und an *Nitella* (HODGE u. Mitarbeiter 1954) hervorgehen. Die Existenz einer distinkten Chloroplastenmembran, an der bei *Chlamydomonas* nach SAGER u. PALADE (1954) sogar scheibenförmige Struktureinheiten (disks) ansetzen sollen, wirft für alle diejenigen ein ernstes Problem auf, die das Algenchromatophor als ein einziges Granum auffassen möchten. Will man phylogenetische Betrachtungen anstellen, so kann selbstverständlich nur das granalose Algenchromatophor als Ausgangspunkt gewählt und mit den Plastiden der höheren Pflanzen homologisiert werden. — Die von SPONSLER u. BATH (1949) bei *Ankistrodesmus falcatus* mit anderer Technik aufgefundenen stark elektronenstreuenden und für Grana gehaltenen Partikel dürften nichts anderes als Reservelipoide gewesen sein. Da über den physiologischen Zustand des benutzten Algenmaterials nichts ausgesagt wird, lassen sich keine weiteren Schlüsse aus den Totalpräparaten ziehen.

Die auffälligste Eigenschaft des *Ankistrodesmus*-Chromatophors ist seine regelmäßig auftretende Maschenstruktur, die durch das Auseinanderweichen von Doppellamellen oder Doppellamellen-Aggregaten bedingt ist. Es kann nicht bestritten werden, daß durch den Polymerisierungsprozeß beim Einbettungsverfahren vorhandene Abstände verändert und auch vergrößert werden können. Jedoch entstehen keine

neuen Maschen durch die Einbettungsmethode, wie die lichtoptischen Untersuchungen an lebendem *Ankistrodesmus*-Material gezeigt haben. — Ähnliche Maschenstrukturen sind gelegentlich beobachtet und meist als Artefakte gedeutet worden. So beschreiben z. B. HODGE u. Mitarbeiter (1954) bei isolierten, verquellenden *Nitella*-Chloroplasten Vergrößerung der Interlamellarabstände („Vakuolisation"). WOLKEN u. PALADE (1953) beobachteten besonders nach Fixierung bei niedrigem p_H-Wert Maschenbildung in den *Euglena*-Chloroplasten. Letztere Autoren lassen ausdrücklich auch das Vorkommen solcher Maschen in vivo offen. VON WETTSTEIN (1954) nimmt an, daß das Auseinanderweichen der Lamellen bei *Fucus* durch eingelagerte Assimilate bedingt ist. Diese Frage wird weiter geprüft.

Zusammenfassung.

In den Kulturen von *Ankistrodesmus braunii* treten zwei verschiedene Zelltypen auf: langgestreckte Zellen und kurze, gedrungene Formen. Die Chromatophoren beider Zelltypen zeigen bei Beobachtung im Hellfeld 2 mit gekreuzten Polarisationsfiltern eine Maschenstruktur. Im elektronenoptischen Bild werden in den Chromatophoren als Struktureinheit 280—300 Å dicke Doppellamellen sichtbar. Diese Doppellamellen setzen sich aus zwei Einzellamellen von je 80 Å Dicke, zwischen denen sich ein Abstand von 100—150 Å befindet, zusammen. Die Stärke wird nicht innerhalb der Doppellamellen, sondern zwischen diesen gebildet. Die Chromatophormaschen entstehen durch Auseinanderweichen von Doppellamellen oder Doppellamellen-Aggregaten. Die Maschenstruktur wird bei der Teilung an die Tochterorganismen weitergegeben.

Literatur.

ALBERTSSON, P. A., and H. LEYON: The structure of chloroplasts. V. Chlorella pyrenoidea Pringsheim studied by means of electron microscopy. Exper. Cell Res. **7**, 288—290 (1954). — GOTTSCHEWSKI, G. H. M.: Über die Anwendungsmöglichkeiten der neuen Leitz-Phasenkontrasteinrichtung mit Kondensor nach HEINE. Z. wiss. Mikrosk. **61**, 185—200 (1953). — GRANICK, M. S.: Chloroplast structure and inheritance. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 1. 1955. — HODGE, A. J., A. B. HOPE, D. J. MCLEAN and F. V. MERCER: Fine structure of Nitella chloroplasts. J. Appl. Physiol. **25**, 1463—1464 (1954). — LEYON, H.: The structure of chloroplasts III. A study of pyrenoids. Exper. Cell Res. **6**, 497 bis 505 (1954a). — The structure of chloroplasts IV. The development and structure of the Aspidistra chloroplast. Exper. Cell Res. **7**, 265—273 (1954b). — LEYON, H., u. D. VON WETTSTEIN: Der Chromatophorenfeinbau bei den Phaeophyceen. Z. Naturforsch. **9b**, 471—475 (1954). — OETTLI, M.: Recherches experimentales sur cinq espèces élémentaires d'Ankistrodesmus. Bull. Soc. Bot. Genève **19**, 1—91 (1927). — PALADE, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. J. of Exper. Med. **59**, 285—297 (1952). — SAGER, R., and G. E. PALADE: Chloroplast structure in green and yellow strains of Chlamydomonas. Exper. Cell Res. **7**, 584—588

(1954). — Sponsler, O. L., and J. D. Bath: Electron microscope studies of submicroscopic structures of Ankistrodesmus falcatus. Amer. J. Bot. **36**, 756—758 (1949). — Steinmann, E., and F. S. Sjöstrand: The ultrastructure of chloroplasts. Exper. Cell Res. **8**, 15—23 (1955). — Tamiya, H., T. Iwamura, K. Shibata, E. Hase and T. Nihe: Correlations between photosynthesis and light independant metabolism in the growth of Chlorella. Biochim. et Biophysica Acta **12**, 23—40 (1953). — West, G. S., and F. E. Fritsch: A Treatise on the British Fresh Water Algae. Cambridge 1927. — Wettstein, D. von: Formwechsel und Teilung der Chromatophoren von *Fucus vesiculosus*. Z. Naturforsch. **9**b, 476—481 (1954). — Wolken, J. J., and G. E. Palade: An electron microscope study of two flagellates Chloroplast structure and variation. Ann. New York Acad. Sci. **65**, 873—881 (1953).

Prof. Dr. Kurt Steffen, Marburg a. d. Lahn, Botanisches Institut, Pilgrimstein 4 und cand. rer. nat. Friedrich Walter, Wetzlar a. d. Lahn, Neustadt 116.

Aufnahmebedingungen.

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Grundriß der Botanik

Von Dr. **Otto Stocker**, Professor der Botanik an der Technischen Hochschule Darmstadt. Mit 303 Abbildungen. VIII, 264 Seiten Gr.-8°. 1952. Ganzleinen DM 16.80

Inhaltsübersicht: Einleitung: **Historische und erkenntnismäßige Grundlagen.** — I. Geschichte. — II. Umgrenzung und Einteilung. — **A. Systematik (Taxonomie).** — I. Prinzipien. — II. Die Hauptgruppen des Pflanzenreiches. — **B. Morphologie.** — I. Zytologie. — II. Histologie und Organographie. — **C. Physiologie.** I. Zellphysiologische Grundlagen. — II. Stoffwechselphysiologie. — III. Bewegungsphysiologie. — IV. Entwicklungsphysiologie. — **D. Ökologie.** — I. Anpassungen an besondere Standortsbedingungen. — II. Anpassungen an besondere Lebensweisen. — **E. Geobotanik (Pflanzengeographie).** — I. Floristik. — II. Soziologie. — **F. Quantenbiologie (Biophysik).** — Sachverzeichnis.

Aus den Besprechungen: Zum Unterschied zu den in den letzten Jahren erschienenen deutschsprachigen Lehrbüchern größeren Umfangs handelt es sich bei Stockers Buch um einen kurzgefaßten Leitfaden, der aber trotz gedrängter Darstellung die wesentlichen wissenschaftlichen Tatsachen in logischem Zusammenhang und die eine auf der anderen aufbauend bringt. Die schwierige Aufgabe ist, unter Beschränkung auf die allgemeine Botanik und unter Ausschluß einer gesonderten Behandlung der Genetik, vorzüglich gelungen. Der Schwerpunkt der Darstellung liegt in den Abschnitten Morphologie und Physiologie (hier ist die botanische Genetik eingearbeitet), dazu kommen kürzere Abschnitte Systematik, Ökologie, Geobotanik und — erfreulicherweise — Quantenbiologie. Die Tallophyten finden entsprechend ihrer Bedeutung für das allgemeine Verständnis, besonders auch der höheren Organisationen, eingehende Berücksichtigung. Der sehr klare Text wird durch ein ausgezeichnetes reichhaltiges Bildmaterial unterstützt, das zum großen Teil Originale und veränderte ältere Vorlagen enthält. Daß vielfach dem Verfasser besonders naheliegende Themen besonders liebevoll behandelt werden, gereicht dem Werk nur zum Vorteil. Die Ausstattung entspricht allen Anforderungen. „Österreichische Botanische Zeitschrift"

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Fortschritte der Botanik

Begründet von **Fritz von Wettstein.** Unter Zusammenarbeit mit mehreren Fachgenossen und mit der Deutschen Botanischen Gesellschaft herausgegeben von Professor Dr. **Ernst Gäumann,** Zürich, und Professor Dr. **Otto Renner,** München.

Zuletzt erschien:

Sechzehnter Band:

Bericht über das Jahr 1953

Mit 40 Abbildungen. IV, 380 Seiten Gr.-8°. 1954. DM 46.—; Ganzleinen DM 48.80

Inhaltsübersicht: **Morphologie: Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Zelle.** Von Professor Dr. L. Geitler, Wien. — **Morphologie einschließlich Anatomie.** Von Professor Dr. W. Troll und Professor Dr. H. Weber, Mainz. — **Entwicklungsgeschichte und Fortpflanzung.** Von Professor Dr. O. Jaag, Zürich. — **Submikroskopische Morphologie.** Von Priv.-Dozent Dr. K. Mühlethaler, Zürich. — **Systemlehre und Pflanzengeographie: a) Systematik und Stammesgeschichte der Pilze.** Von Dozent Dr. H. Kern, Zürich. — **b) Systematik der Spermatophyta.** Von Professor Dr. K. Suessenguth, München. — **Paläobotanik.** Von Professor Dr. K. Mägdefrau, München. (Folgt in Band XVII.) — **Systematische und genetische Pflanzengeographie.** Von Professor Dr. F. Firbas, Göttingen, und Priv.-Dozent Dr. H. Merxmüller, München. — **Ökologische Pflanzengeographie.** Von Professor Dr. H. Walter, Stuttgart-Hohenheim, und Professor Dr. H. Ellenberg, Hoisdorf/Holstein. — **Ökologie.** Von Professor Dr. Th. Schmucker, Hann. Münden. — **Physiologie des Stoffwechsels: Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensprozesse.** Von Professor Dr. W. Simonis, Hannover. (Folgt in Band XVII.) — **Zellphysiologie und Protoplasmatik.** Von Professor Dr. H. J. Bogen, Marburg/Lahn. — **Wasserumsatz und Stoffbewegungen.** Von Professor Dr. B. Huber, München. (Folgt in Band XVII.) – **Mineralstoffwechsel.** Von Professor Dr. H. Burström, Lund (Schweden). – **Stoffwechsel organischer Verbindungen I** (Photosynthese). Von Professor Dr. A. Pirson, Marburg/Lahn. (Folgt in Band XVII.) — **Stoffwechsel organischer Verbindungen II.** Von Professor Dr. K. Paech, Tübingen. (Folgt in Band XVII.) — **Physiologie der Organbildung: Vererbung: a) Genetik der Mikroorganismen.** Von Professor Dr. Dr. H. Marquardt, Freiburg i. Br. — **b) Genetik der Samenpflanzen.** Von Professor Dr. C. Harte, Köln. (Folgt in Band XVII.) — **Cytogenetik.** Von Professor Dr. J. Straub, Köln. (Folgt in Band XVII.) — **Wachstum.** Von Dozent Dr. J. Reinert, Tübingen. — **Entwicklungsphysiologie.** Von Professor Dr. A. Lang, Los Angeles (Calif.). — **Viren: a) Pflanzenpathogene Viren.** Von Oberreg.-Rat Dr. E. Köhler, Braunschweig. (Folgt in Band XVII.) — **b) Bakteriophagen.** Von Dozent Dr. Dr. W. Weidel, Tübingen. (Folgt in Band XVII.) — **Sachverzeichnis.**

Fünfzehnter Band:

Bericht über das Jahr 1952

Mit 34 Abbildungen. IV, 549 Seiten Gr.-8°. 1954. DM 62.80

Inhaltsübersicht: **Morphologie: Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Zelle.** Von Professor Dr. L. Geitler, Wien. — **Morphologie einschließlich Anatomie.** Von Professor Dr. W. Troll und Professor Dr. H. Weber, Mainz. (Folgt in Band XVI.) — **Entwicklungsgeschichte und Fortpflanzung.** Von Professor Dr. O. Jaag, Zürich. (Folgt in Band XVI.) — **Submikroskopische Morphologie.** Von Privatdozent Dr. K. Mühlethaler, Zürich. (Folgt in Band XVI.) — **Systemlehre und Pflanzengeographie: Systematik und Stammesgeschichte der Pilze.** Von Dozent Dr. H. Kern, Zürich. (Folgt in Band XVI.) — **Systematik der Spermatophyta.** Von Professor Dr. K. Suessenguth, München. — **Paläobotanik.** Von Professor Dr. K. Mägdefrau, München. — **Systematische und genetische Pflanzengeographie.** Von Professor Dr. F. Firbas, Göttingen. — **Ökologische Pflanzengeographie.** Von Professor Dr. H. Walter, Stuttgart-Hohenheim. (Folgt in Band XVI.) — **Ökologie.** Von Professor Dr. Th. Schmucker, Hann. Münden. — **Physiologie des Stoffwechsels: Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensprozesse.** Von Professor Dr. W. Simonis, Hannover. — **Zellphysiologie und Protoplasmatik.** Von Professor Dr. H. J. Bogen, Marburg a. d. Lahn. — **Wasserumsatz und Stoffbewegungen.** Von Professor Dr. B. Huber, München. — **Mineralstoffwechsel.** Von Professor Dr. H. Burström, Lund (Schweden). — **Stoffwechsel organischer Verbindungen I.** (Photosynthese). Von Professor Dr. A. Pirson, Marburg a. d. Lahn. (Folgt in Band XVI) — **Stoffwechsel organischer Verbindungen II.** Von Professor Dr. K. Paech, Tübingen. — **Physiologie der Organbildung: Vererbung. a) Genetik der Mikroorganismen.** Von Professor Dr. H. Marquardt, Freiburg i. Br. (Folgt in Band XVI.) — **b) Genetik der Samenpflanzen.** Von Professor Dr. C. Harte, Köln-Riehl. — **Cytogenetik.** Von Professor Dr. J. Straub, Köln-Riehl. (Folgt in Band XVI.) — **Wachstum und Bewegung.** Von Professor Dr. H. v. Guttenberg, Rostock. — **Entwicklungsphysiologie.** Von Professor Dr. A. Lang, Los Angeles (Calif.). — **Viren. a) Pflanzenpathogene Viren.** Von Oberreg.-Rat Dr. E. Köhler, Braunschweig. — **b) Bakteriophagen.** Von Dr. W. Weidel, Tübingen. — **Sachverzeichnis.**

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, und ein Prospekt des Springer-Verlages, Wien, bei.

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg.
Printed in Germany.